



**HAL**  
open science

# Implication de l'adiponectine et des microARNs dans les mécanismes associés aux effets induits par l'activité et l'inactivité physique

Caroline Gastebois

## ► To cite this version:

Caroline Gastebois. Implication de l'adiponectine et des microARNs dans les mécanismes associés aux effets induits par l'activité et l'inactivité physique. Physiologie [q-bio.TO]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10268 . tel-01399629

**HAL Id: tel-01399629**

**<https://theses.hal.science/tel-01399629>**

Submitted on 20 Nov 2016

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

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

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON  
*Présentée devant*  
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON1  
L'ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES ET SANTE  
Spécialité biologie

*Pour l'obtention du*  
DIPLOME DE DOCTORAT  
(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 19 Novembre 2015

Par

**Caroline GASTEBOIS**

**IMPLICATION DE L'ADIPONECTINE ET DES MICROARNS DANS LES  
MECANISMES ASSOCIES AUX EFFETS INDUITS PAR L'ACTIVITE ET  
L'INACTIVITE PHYSIQUE**

Directeurs de thèse : Dr Chantal SIMON, MD, PhD

Dr Etienne LEFAI, PhD

Membres du Jury :

Dr Elvire GOUZE - Rapporteur

Dr Damien FREYSSNET - Rapporteur

Dr Fabrice BERTILE- Rapporteur

Dr Fabien VAN COPPENOLLE - Examineur

Dr Chantal SIMON - Directeur de thèse

Dr Etienne LEFAI – Directeur de thèse

Laboratoire de recherche en Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et  
Nutrition

CarMeN U INSERM 1060

**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1**



**Président de l'Université**

Vice-président du Conseil d'Administration  
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie  
Universitaire  
Vice-président du Conseil Scientifique  
Directeur Général des Services

**M. François-Noël GILLY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID  
M. le Professeur Philippe LALLE  
M. le Professeur Germain GILLET  
M. Alain HELLEU

**COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard  
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles  
Mérieux  
Faculté d'Odontologie  
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques  
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation  
Département de formation et Centre de Recherche en  
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE  
Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON  
Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS  
Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA  
Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON  
Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

**COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies  
Département Biologie  
Département Chimie Biochimie  
Département GEP  
Département Informatique  
Département Mathématiques  
Département Mécanique  
Département Physique  
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et  
Sportives  
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon  
Polytech Lyon  
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique  
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1  
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education  
Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI  
Directeur : M. le Professeur F. FLEURY  
Directeur : Mme Caroline FELIX  
Directeur : M. Hassan HAMMOURI  
Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE  
Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV  
Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID  
Directeur : M. Jean-Claude PLENET  
Directeur : M. Y.VANPOULLE  
Directeur : M. B. GUIDERDONI  
Directeur : M. P. FOURNIER  
Directeur : M. G. PIGNAULT  
Directeur : M. le Professeur C. VITON  
Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE  
Directeur : M. N. LEBOISNE



# REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'aimerais remercier Hubert Vidal pour m'avoir permis de préparer ma thèse dans son laboratoire de recherche. Merci également pour vos encouragements et votre soutien jusque dans l'après thèse.

Je tiens à remercier les membres de mon jury. Un grand merci à Madame le Docteur Elvire Gouze et Messieurs les Docteurs Damien Freyssenet et Fabrice Bertile pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à Monsieur le Docteur Fabien Van Coppenolle pour m'avoir apporté ses conseils et connaissances tout au long de ces années et pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.

Je remercie également sincèrement ma directrice de thèse Chantal Simon pour m'avoir soutenue et encouragée à réaliser ce travail. Pendant ces trois années, presque quatre, j'ai découvert avec vous la recherche en biologie humaine, domaine qui pour moi venant de l'écologie me semblait éloignée, mais qui a su me séduire. Merci pour tous vos précieux conseils et de m'avoir poussée à aller plus loin.

Je souhaite également remercier Etienne Lefai, mon deuxième directeur de thèse, pour m'avoir encadrée et soutenue dans cette thèse. Merci pour ta patience notamment quand il était question de la compréhension des voies moléculaires.

Mes remerciements vont également à Sophie Rome, sans qui mon travail de thèse n'aurait sûrement pas porté sur les microARNs. Merci de m'avoir initié à cet univers si particulier et pour m'avoir impliqué dans tes projets.

Quand il est question de microARN, je peux que penser à toi, Audrey, ma copine de TaqMan ! Merci beaucoup pour tes nombreux conseils, nos nombreuses discussions et franches rigolades en pièce ARN (et pas que !). Ta bonne humeur et ton entrain furent des plus agréables.

Un immense merci à Vanessa E. pour ta patience et ta motivation à toute épreuve lorsqu'il était question de biomol... Et oui ces fameux adénovirus nous

aurons tenu en haleine pendant longtemps ! Merci pour ton soutien sans faille pendant ces trois années.

Merci infiniment Stéphanie pour tout le travail que tu as effectué, et tes nombreux coups de main pendant cette thèse ☺ Merci pour ton oreille attentive, ta gentillesse. Essaie de garder du peps pour toi !

Merci Christine pour avoir enseigné à la novice que j'étais la culture cellulaire et le western blot.

Après ce tour de l'équipe 2, merci à d'autres membres du laboratoire qui ont tenu une place toute particulière.

Merci MAC !!! Merci pour ton écoute, pour ces échanges nombreux, scientifiques, bijoux, municipalité, et j'en passe... ! Merci pour ton sourire et ta bonne humeur qui ont ponctué mon quotidien.

Merci Claudie ☺ pour ton soutien et pour les nombreuses discussions nature et conception déco, et j'en oublie ...! Merci pour ton sourire et ta franchise.

Merci Bérengère pour tes précieux conseils et ton soutien de jeune docteur sur cette fin de thèse ! Ta discrétion et ta douceur n'ont été que des plus appréciables en cette fin d'exercice.

Merci au trio du plateau génomique, grande et petite Manue, et Sandra, et à Aurélie, sur le plateau, sans être du plateau et maintenant en bas ;) merci pour vos précieux conseils en matière de qPCR, et aussi pour nos nombreux autres échanges sur des sujets existentiels pendant les pauses déjeuners/café.

Merci Brigitte R. pour nos discussions nature, moto et chaponost ! Et aussi, merci pour ton efficacité administrative ☺

Merci Luciano pour tes encouragements, ton soutien et ton sourire communicatif pendant la thèse et pour l'après thèse.

Et non... je ne vous ai pas oublié mes amis doctorants, masters et autres compères du deuxième ☺ Je vais commencer par celle qui ne sera pas là pour fêter la thèse dignement :

Ma che Bella ! Merci Vaness' pour toutes ces bonnes blagounettes et actions rocambolesques ! Qu'est-ce que tu me manque en cette fin de thèse ! Merci de m'avoir montré qu' « on peut porter des talons de 58 cm » (Theurey 2015) en recherche et faire de la rando avec ! Ma grande blonde, bon courage pour la fin... Belge !

Bonjour M...lle Sabrina ;) Merci à toi pour ton sourire et tes bonnes vanes que je kiffe ! Avec Vaness' on a fait un trio d'enfer, poussez-vous de là les mecs, on

assure ! Merci pour mes 15 kg pris en thèse grâce à tes talents de pâtissière et à notre goût commun pour les pints ;) C'est quand qu'on y retourne ? (T'as vu celui-là il est bien placé !).

Ma belle Marwa ! (dur dur de varier les surnoms vous êtes toutes des bombes dans ce bureau !) Je me demandais bien ce que ça allait donner ta montée dans le bureau, et j'en suis plus que ravie, tu as été une voisine bluffante avec ta bonne humeur, ton sourire et tes tacles tellement bien placés ! \*

Elsouilllllllllle ! Que dire de la nouvelle geek du bureau ☺ Tu n'es plus la petite dernière du bureau, mais ta découverte aura été tardive, et nos nombreuses discussions depuis m'ont fait que plus t'apprécier ! En tant qu'écolo je devrais te mettre des fessées pour pleins de choses mais je te kiffe grande brune ! Vas-y mollo sur le redbull quand même ;)

Merci à Manu La Suisse-qui-est-plus-trop-La-Suisse-dernièrement ;) Merci pour ta planitude, ta gentillesse, ton optimisme et surtout ta non-prise de tête à toute épreuve ! Désolée pour les nombreuses discussions de filles dont tu aurais probablement préféré ne jamais être témoin ☺ ! On s'Arêches-Beaufort bientôt ? \*

Manu Cheveux-Longs, t'es plus un étudiant mais tu as tout d'un étudiant ! Les bonnes blagues, les bonnes pintes, les bonnes discussions le soir tard au labo alors qu'il reste que nous deux dans le bâtiment ! Merci pour la musique, ton temps et tes encouragements ☺

Kevin, mon compère de promo de thèse ! Merci pour nos bons fou-rires, ta bonne humeur et tes passages au labo ! Dommage que tu ne nous as pas rejoint dans ce bureau de thésards, ta participation aurait été explosive ! T'es le prochain, courage !

Benoit, Florian, vous êtes les p'tits nouveaux ☺ La graine de doctorants ! Un thésard en fin de thèse n'est jamais le bon exemple, désolée pour les instants de folies dont vous avez déjà été témoins ;) Prenez soin des anciens !

A Nobel, Darwin et Christophe, je compte sur vous pour animer et embellir le bureau.

Je ne peux pas terminer le tour des remerciements sans oublier les anciens qui m'ont accompagné pendant cette thèse : Ele, ma vénézuélienne préférée (bon je connais que toi mais quand même !) ton sourire et ton accent me manque ; Momo, ma sportive blondâsse préférée, t'es pas bien loin alors je vais pas te lâcher comme ça, à nous le ski et les randos ; les filles faut qu'on aille danser ! ; Lulu, toujours un compliment et le sourire aux lèvres, merci pour ta générosité si naturelle ☺ ;



Roxanne, merci pour ton sourire, ta douceur et ta gentillesse, gardes-en en réserve ; Cyrielle, la médecin surbookée qui malgré cela reste d'un optimisme à toute épreuve, merci pour ton sourire et ta simplicité ! ; Jujube, mon mentor de SAS, merci pour nos riches échanges stateux et bien sûr pour ton amitié ; Emily avec ta frenglish attitude ☺

Merci aussi aux anciens thésards mecs Clément, Kévin, Alex, Geoffrey ☺ de m'avoir fait une place dans votre bureau 100% testostérone (aujourd'hui c'est plutôt progestérone). Merci pour tous les bons conseils ! Oh et puis bien sûr, merci mon Pierrot !!! Sans toi, cette thèse n'aurait pas été la même. Comme je te l'ai déjà longuement écrit, tu as tenu une place toute particulière dans cette aventure. Mais bon... ton absence en ce Jour J montre que les italiennes ont de meilleurs arguments que la blonde plantureuse avec du cambouis sur les mains ;) A très vite !

\* Merci à vous deux, car j'ai trouvé auprès de vous, deux compatriotes dans nos choix de vieux ;)

Et bien sûr, je tiens à remercier également tous les autres membres du laboratoire qui ont permis chacun à leur façon que ces trois années à vos côtés soient des plus agréables.

Je tiens notamment à tous vous remercier pour votre implication pour la réalisation du calendrier annuel de CarMeN, vous avez tous été des modèles au top ! Je vous attends pour la prochaine édition ;)

Merci également à un autre trio, mais de mecs cette fois : Colin, Théo et Romain, merci les gars pour les rares pauses-déjeunes au self, mais aussi et surtout pour votre sympathie et les soirées ☺

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées pendant ma thèse dont la présence, les encouragements et la bonne humeur ont été des sources d'inspirations : Martine Laville, Emmanuelle Canet-Soulas, Stéphanie Auboussier, Valérie Sauvinet, Laure Gabert, Sophie Simon, Cyrielle Clapé, Aurélia et Ophélie Maire, Thomas Bastian, Claire Morelli, Murielle Bourdin, Nathalie Allioli, Zohra Béchir, en espérant oublier personne...

Il est maintenant temps de remercier mon entourage dont le soutien sans faille a été nécessaire pour mener ce projet à bout.

A mes amis, merci de votre présence pendant toutes ces années. Merci mon Canard, mon Poussin, Anne-Laure, Fox, pour votre amour, votre grande amitié, votre simplicité ! Merci mes filleuls, Nathanael et Antoine pour tous ces moments où vos yeux d'enfants ne voyaient que leur marraine me permettant juste de profiter de l'instant présent !

A mes parents, merci Maman, merci Papa, je ne vous remercierais jamais assez pour votre soutien. Je sais que cela n'a pas été facile tous les jours, avec cette thèse chronophage qui m'a laissé que trop peu de temps à vos côtés, et le peu remontée comme une cocotte-minute et à fleur de peau. Merci pour votre foi inébranlable en mes capacités au cours de toutes ces années d'études et de votre fierté que vous me communiquez. Je vous aime. A mes frères, merci Charlot, merci Willy, pour le soutien à la gamine que je suis et les moments partagés avec vous qui me faisaient penser à toute autre chose ☺

A mes « beaux » parents, merci Monique et Hubert, merci pour votre soutien depuis Blois, pour les week-ends pauses en région centre, où une bonne grasse mat' (voir plus !) et une bonne gastronomie m'ont permis de me ressourcer ! Merci à ma « belle » sœur Marion et Math' pour tous ces moments de convivialité ☺

A Coco, ça y est je l'ai fait ! J'aurai aimé te remercier en ce jour tout particulier.

A mes collègues de plongée, vous en aurez entendu parler de cette thèse ! Merci de m'avoir permis de décrocher de temps à autre.

A tout mon entourage, famille, amis, voisins, qui ont toujours eu des mots de soutien pendant ces trois années de thèse. Merci pour tout.

Et j'aimerais finir par remercier ma moitié, Aurélien, qui finalement a vécu cette thèse tout autant que moi. Nous avons sauté ensemble dans cette aventure, pour finaliser mon projet, pour construire notre vie. Merci pour ton soutien indispensable, pour avoir su trouver les bons mots, la bonne façon de m'encourager (c'était pas gagné au début !). A l'excitation du début de thèse, la fatigue et l'irritabilité ont pris place en cette fin d'aventure et tu as su me gérer, me rassurer, merci d'avoir été mon roc sur lequel j'ai pu me raccrocher. Merci.



# TABLE DES MATIERES

**RESUME**

**SUMMARY**

**ABBREVIATIONS**

**TABLE DES ILLUSTRATIONS**

**COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES**

**PUBLICATIONS**

**PREAMBULE**

**INTRODUCTION**

<b>I. EXERCICE, SEDENTARITE ET SANTE.....</b>	<b>31</b>
A. EXERCICE, SEDENTARITE ET SANTE – PERSPECTIVE HISTORIQUE.....	31
B. TERMINOLOGIE .....	33
1. <i>Activité physique et exercice</i> .....	33
2. <i>Inactivité physique et sédentarité</i> .....	34
C. LES CARACTERISTIQUES DE L'ACTIVITE PHYSIQUE .....	36
D. EFFETS DE L'ACTIVITE PHYSIQUE, DE L'INACTIVITE PHYSIQUE ET DE LA SEDENTARITE SUR LA SANTE.....	37
E. MECANISMES BIOLOGIQUES SOUS-TENDANT LES EFFETS DE L'ACTIVITE PHYSIQUE ET DE LA SEDENTARITE SUR LA SANTE .....	40
1. <i>Protocoles d'étude</i> .....	40
2. <i>Mécanismes biologiques sous-jacents de l'activité et inactivité physique</i> ....	41
a. Le muscle squelettique .....	42
b. Les effets de l'activité physique au-delà du muscle .....	46
F. QUESTIONS EN SUSPENS .....	48
<b>II. ADIPONECTINE ET SES LIENS AVEC L'ACTIVITE PHYSIQUE .....</b>	<b>51</b>
A. GENERALITES .....	51
B. STRUCTURE, SYNTHÈSE ET REGULATION DE L'ADIPONECTINE .....	52
1. <i>Structure de l'adiponectine</i> .....	52
2. <i>Synthèse de l'adiponectine</i> .....	53
3. <i>Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de l'adiponectine</i> ....	54
a. Le gène de l'adiponectine .....	54
b. Régulation post-transcriptionnelle de l'adiponectine.....	56
c. Mécanismes de sécrétion et régulation .....	57
d. Cinétique et métabolisme de l'adiponectine .....	57
C. EFFETS BIOLOGIQUES DE L'ADIPONECTINE .....	58
1. <i>Effets systémiques de l'adiponectine</i> .....	58

a.	Effets sur le métabolisme des glucides et l'insuline .....	58
b.	Effets sur l'insuline .....	59
c.	Effets anti-inflammatoires .....	60
d.	Effets sur le métabolisme énergétique .....	60
2.	<i>Effets tissulaires</i> .....	60
3.	<i>Structure des récepteurs de l'adiponectine</i> .....	60
a.	Récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 .....	61
b.	Récepteur Cadhérine-T.....	62
4.	<i>Régulation de l'expression des récepteurs de l'adiponectine</i> .....	63
5.	<i>Sensibilité à l'adiponectine</i> .....	64
6.	<i>Voies de signalisation cellulaire de l'adiponectine</i> .....	65
a.	Transduction du signal via APPL1 .....	66
b.	AMPK .....	66
c.	Les PPARs .....	67
d.	RAS/MAPK.....	67
e.	Les céramides.....	68
f.	NF-κB .....	68
D.	IMPACT DE L'ACTIVITE PHYSIQUE SUR L'ADIPONECTINE ET SES EFFETS .....	68
1.	<i>Effets de l'exercice sur la composition corporelle, le principal facteur de confusion des effets chroniques de l'activité physique sur l'adiponectine plasmatique</i> .....	69
2.	<i>Effets de l'exercice aigu sur l'adiponectine plasmatique</i> .....	71
3.	<i>Exercice et adiponectine tissulaire</i> .....	72
4.	<i>Exercice et métabolisme de l'adiponectine</i> .....	73
5.	<i>Exercice et récepteurs à l'adiponectine</i> .....	73
E.	QUESTIONS EN SUSPENS .....	75
<b>III.</b>	<b>MICROARNS ET ACTIVITE/INACTIVITE PHYSIQUE .....</b>	<b>77</b>
A.	GENERALITES .....	77
1.	<i>Un peu d'histoire</i> .....	77
2.	<i>Identification des microARNs et de leurs cibles</i> .....	78
B.	BIOSYNTHESE DES MICROARNS .....	79
1.	<i>Organisation génomique des microARNs</i> .....	79
2.	<i>Transcription des microARNs</i> .....	81
a.	Voie canonique.....	83
b.	Voies non-canoniques .....	84
i.	Voie des mitrons, indépendante de Drosha.....	84
ii.	Les microARNs dérivés des snoARNs.....	85
iii.	Les microARNs dérivés des shARNs.....	85
iv.	Voie non-canonique indépendante de Dicer.....	85
c.	Nomenclature des microARNs .....	85
C.	REGULATIONS DE L'EXPRESSION DES MICROARNS .....	86
1.	<i>Régulation des gènes codants pour les microARNs</i> .....	86
2.	<i>Régulation de la maturation des microARNs</i> .....	87
D.	MECANISMES D'ACTION DES MICROARNS .....	88
1.	<i>Reconnaissance de l'ARNm</i> .....	88
2.	<i>Inhibition de l'expression génique par les microARNs</i> .....	89
a.	Clivage et dégradation de l'ARNm .....	89
b.	Inhibition de la traduction de l'ARNm.....	90
i.	Voie dépendante de la déadénylation de l'ARNm cible.....	90
ii.	Inhibition de l'initiation de la traduction.....	90
iii.	Séquestration des ARNm dans des corps cytoplasmiques.....	91
c.	Inhibition après l'initiation .....	92
d.	Augmentation de l'expression génique par les microARNs .....	92

E.	FONCTIONS BIOLOGIQUES DES MICROARNs.....	93
1.	<i>Altérations génétiques</i> .....	93
2.	<i>microARNs tissulaires et pathologies</i> .....	94
3.	<i>Biomarqueurs circulants de pathologies</i> .....	94
F.	MICROARNs ET ACTIVITE/INACTIVITE PHYSIQUE .....	95
1.	<i>Exercice et système nerveux central</i> .....	95
2.	<i>Le système cardiovasculaire</i> .....	96
3.	<i>Le muscle squelettique</i> .....	97
a.	Exercice de résistance .....	97
b.	Exercice d'endurance .....	99
c.	Les microARNs circulants.....	100
G.	QUESTIONS EN SUSPENS .....	102

## OBJECTIFS ET APPROCHES

### MATERIELS ET METHODES

A.	PROTOCOLES IN VIVO .....	110
1.	<i>Protocoles cliniques</i> .....	110
a.	Protocole d'inactivité physique sévère – bed-rest.....	110
i.	Population d'étude et intervention .....	110
ii.	Paramètres métaboliques et marqueurs hépatiques .....	111
b.	Protocole d'activité et d'inactivité physique modérée - LIPOX.....	112
i.	Population d'étude et critères d'inclusion .....	113
ii.	Mesure du niveau d'activité/inactivité physique .....	114
iii.	Données anthropométriques et composition corporelle.....	115
iv.	Intervention.....	115
v.	Prélèvements biologiques .....	116
vi.	Paramètres métaboliques plasmatiques et tissulaires.....	117
c.	Autres protocoles cliniques.....	117
2.	<i>Protocole animal</i> .....	118
B.	MODELES CELLULAIRES .....	120
1.	<i>Lignées cellulaires</i> .....	120
2.	<i>Culture primaire</i> .....	121
C.	MODULATION DE L'EXPRESSION GENIQUE <i>IN VITRO</i> .....	122
1.	<i>Construction de deux adénovirus recombinants codant pour miR-148b et miR-21 et infections adénovirales</i> .....	122
a.	Généralités.....	122
b.	Clonage des pre-miARNs de miR-148b et miR-21 .....	123
c.	Génération des adénovirus recombinants pour miR-148b et miR-21 ...	125
d.	Titration .....	126
2.	<i>Surexpression par infections adénovirales dans les lignées cellulaires</i> .....	127
3.	<i>Surexpression par transfection de plasmides codant miR-148b et miR-21.</i>	127
4.	<i>Inhibition par utilisation d'anti-miRs</i> .....	128
D.	ANALYSE DE LA SIGNALISATION DE L'INSULINE .....	128
E.	MESURE D'EXPRESSION GENIQUE ET PROTEIQUE .....	129
1.	<i>Mesure de l'expression génique par PCR quantitative en temps réel</i> .....	129
a.	Extraction des ARN totaux .....	129
i.	Cellules .....	129
ii.	Sérum (miRNAs) .....	129
b.	Transcription inverse.....	131
2.	<i>RT-qPCR en temps réel des gènes</i> .....	131

3.	<i>RT-qPCR en temps réel des microARNs</i> .....	133
4.	<i>Analyse transcriptomique des microARNs par puces à ADN</i> .....	134
a.	PCR quantitative en temps réel par cartes TLDA .....	134
b.	Sélection du microARN endogène de référence.....	135
c.	Sélection des microARNs d'intérêts.....	137
F.	MESURE DE L'EXPRESSION PROTEIQUE PAR WESTERN BLOT.....	137
1.	<i>Préparation des extraits protéiques</i> .....	137
2.	<i>Western Blot</i> .....	138
G.	ANALYSES DES RESULTATS ET STATISTIQUES .....	138
1.	<i>Analyses des gènes cibles et voies de signalisation</i> .....	138
2.	<i>Analyses statistiques</i> .....	139

## RESULTATS

**Article 1 :** Effect of enforced physical inactivity induced by 60-d of bed rest on hepatic markers of NAFLD in healthy normal-weight women 143

**Article 2 :** Effects of training and detraining on adiponectin plasma concentrations and muscle adiponectin sensitivity in lean and overweight men 155

### ACTIVITE PHYSIQUE ET MICROARNS

A.	SELECTION DES MICROARNS ASSOCIES A L'ACTIVITE PHYSIQUE DANS LIPOX .....	185
B.	NIVEAUX D'EXPRESSION DE MIR-148B DANS LE SERUM .....	187
C.	ASSOCIATIONS ENTRE TAUX CIRCULANTS DE MIR-148B ET PARAMETRES METABOLIQUES .....	188

**Article 3 :** Early Transition from active to inactive status enhances mir-148b expression in skeletal muscle and consequences on insulin signaling 191

## DISCUSSION

A.	ACTIVITE/INACTIVITE PHYSIQUE ET SENSIBILITE A L'INSULINE .....	229
1.	<i>Implication de l'adiponectine dans les effets de l'activité/inactivité physique sur l'insuline</i> .....	230
2.	<i>Implication des microARNs dans les effets de l'inactivité physique sur l'insuline</i> .....	234
B.	ACTIVITE/INACTIVITE PHYSIQUE, OXYDATION LIPIDIQUE ET LIPIDES CIRCULANTS ...	237
C.	INACTIVITE PHYSIQUE ET STOCKAGE ECTOPIQUE .....	238
D.	ACTIVITE ET INACTIVITE PHYSIQUE : EFFETS INDEPENDANTS .....	242
E.	LES MICROARNS CIRCULANTS : DES BIOMARQUEURS DU NIVEAU D'ACTIVITE PHYSIQUE ? .....	243

## REFERENCES

## ANNEXES

# RESUME

Les changements actuels de mode de vie, notamment la sédentarité, sont associés aux maladies chroniques, alors qu'une activité régulière améliore les fonctions métaboliques.

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont pour but d'étudier les effets de différents niveaux d'activité physique, jusqu'à l'inactivité extrême sur des acteurs du dialogue inter-organe comme l'adiponectine et les microARNs, et sur le métabolisme, notamment dans le muscle ou le foie.

Nous démontrons que l'inactivité physique extrême, dans le cadre d'un bed-rest de 60 jours, augmente les marqueurs de l'inflammation hépatique, prémices du développement d'une stéato-hépatite non alcoolique. Nos données montrent que des exercices réguliers peuvent limiter les altérations métaboliques induites par l'inactivité physique.

Nous montrons, ensuite qu'indépendamment des effets de l'activité et l'inactivité physique sur la masse grasse, les concentrations circulantes d'adiponectine sont inversement associées avec le niveau d'activité physique. Nous montrons notamment que les variations des taux circulants d'adiponectine totale avec le niveau d'activité physique sont principalement dû aux variations de la forme de haut poids moléculaire, et ne sont pas expliquées par des variations d'expression de l'adiponectine dans le tissu adipeux ou musculaire. Nous montrons également une relation inverse entre l'insulinémie plasmatique à jeun et les récepteurs de l'adiponectine, et un de ses effecteurs (APPL1) dans le muscle supportant l'amélioration de la sensibilité à l'adiponectine musculaire.

Au cours d'une intervention contrastée et modérée sur le niveau d'activité physique chez l'homme et la souris, nous avons pu montrer que la transition d'un statut actif vers inactif augmentait le niveau d'expression de miR-148b dans le muscle, participant à la dégradation du métabolisme. Notre étude de modulation de l'expression de miR-148b *in vitro* dans les myotubes humains, montre son implication dans la voie de signalisation de l'insuline, et suggère que l'accumulation de miR-148b dans le tissu musculaire peut participer à l'altération de la sensibilité à l'insuline qui est caractéristique des comportements sédentaires persistants.



L'ensemble de ces résultats démontrent que l'étude des acteurs de la signalisation inter-organe est cruciale pour comprendre les mécanismes mis en jeu par les comportements actifs et inactifs, et leurs effets sur la santé.

Mots-clés : activité physique, inactivité physique, métabolisme, cross-talk, adiponectine, microARN

# SUMMARY

Current lifestyle changes, notably sedentary behavior, are associated with chronic diseases, while regular activity improves metabolic functions

The purpose of my work is to examine the effects of different level of physical activity, until extreme inactivity on cross-talk mediators, such as adiponectine and microRNAs, and on metabolism, notably in muscle or liver.

We demonstrate a significant increase of hepatic markers under severe physical inactivity (60d bed-rest), showing the onset of a development of NASH. Our data support that regular exercise can limit these physical inactivity-induced metabolic alterations.

We demonstrate that independently of effects of physical activity and inactivity on fat mass, adiponectin plasma concentrations were negatively related to physical activity level. Our data highlight that variations in total plasma adiponectin with physical activity level are mainly due to changes in HMW adiponectin plasma concentrations, and are unlikely explained by variations in expression of adiponectin in adipose tissue and muscle. We also show an inverse relation between fasting insulin plasma concentrations with both adiponectin receptors, and one of its downstream effector (APPL1) in the muscle, suggesting an improvement of adiponectin muscular sensitivity.

During a contrasted and moderate physical activity intervention in human and mice, we show that transition from activity toward inactivity results in muscle miR-148b content increase, leading to muscle metabolism alteration. Our study on miR-148b expression modulation *in vitro* in human myotubes, show its involvement in insulin signaling pathway in muscle, suggesting that miR-148b accumulation in muscle could participate in the whole body insulin sensitivity degradation, which is a feature of persistent sedentary behavior.

Altogether, these results demonstrate that the study of cross-talk actors is crucial to understand the mechanisms involved in active and inactive behaviors, and their effects on health.

Key-words : physical activity, physical inactivity, metabolism, cross-talk, adiponectine, microRNA

# ABBREVIATIONS

## A

AAC Acronyme pour AST, ALT et CK18  
ACC Acétyl-coenzyme A carboxylase  
AdipoR1 Récepteur de l'adiponectine 1  
AdipoR2 Récepteur de l'adiponectine 2  
AdipoQ Adipose gene Q  
ADN Acide désoxyribonucléique  
ADNc ADN complémentaire  
AEE Dépense énergétique liée à l'activité physique  
AGO Argonaute  
Akt/PKB Protein kinase B  
ALT Alanine aminotransférase  
AMP Adénosine monophosphate  
AMPK AMP-activated protein kinase  
ANGPTL3 Angiopoietin-like 3  
apM1 Aipose most abundant gene transcript 1  
APPL1 Adaptor Protein, Phosphotyrosine Interaction, PH Domain And Leucine Zipper Containing 1  
Arcp30 adipocyte complement-related protein of 30 kDa  
ARN Acide ribonucléique  
ARNm ARN messenger  
ARN pol ARN polymérase  
ARNi ARN interférent  
AST Aspartate aminotransférase  
ATP Adénosine tri-phosphate  
AVP Arginine-8-Vasopressine

## B

BR Bed-rest

BSA Bœuf serum albumine

## C

cAMP Cyclic adenosine monophosphate  
CDH13 Cadherin-13  
CD36 Collagen type I receptor, thrombospondin receptor  
CHA acronyme pour CK18, et des indices HOMA-IR et AST  
CK18 Cytokératine 18  
CMV Cytomégalovirus  
COXII Cytochrome c oxidase subunit II  
CPT1 Carnitine palmitotransférase 1  
CREB cAMP Response Element-binding protein  
Ct Threshold cycle

## D

DGCR8 DiGeorge syndrome chromosomal region 8  
DER Dépense énergétique de repos  
DET Dépense énergétique total  
DXA dual-energy X-ray absorptiometry  
DMEM Dulbercco's Modified Eagle Medium  
dNTPs désoxy-adénine tri-phosphate  
DsbA-L Disulfide-bond A oxidoreductase-like protein  
DTT Dithiothréitol

## E

EBPa Endoplasmic reticulum membrane-associated oxido-reductase-La  
EDM Eau doublement marquée  
EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid  
ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay  
eNOS Endothelial nitric oxide synthase 3  
ErbB3 Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3  
ERK Extracellular signal-regulated kinases  
ERp44 Endoplasmic reticulum protein of 44 kDa  
Ero1-La endoplasmic oxidoreductin-1-like  
EX Exercice

## F

FATP1 Fatty acid transport protein 1  
FLST1 Follistatin-like 1  
FM Masse grasse  
FOXO1 Forkhead box protein O1  
FXR1 Fragile X related protein 1

## G

GBP28 Gelatin-binding protein of 28 kDa  
GFP Green fluorescent protein  
GLUT4 Glucose transporter type 4  
GPI Glycosyl-phosphatidylinositol  
GTP Guanosine triphosphate  
GW182 Glycine-tryptophan protein of 182 kDa

## H

Hb1Ac Hémoglobine glyquée  
HDAC4 Histone Deacetylase 4  
HDL High-density lipoprotein  
HHS Département de la Santé et des Services sociaux des États  
HIF-1 Hypoxia inducible factor 1  
HMW Haut poids moléculaire  
HOMA-IR homeostasis model assessment – insulin resistance

**I**

IGF-1 Insulin-like growth factor 1  
 IKK I kappa B kinase  
 IL Interleukine  
 iNOS Nitrique oxyde synthase inductible  
 INSERM Institut National de la Santé et de  
 la Recherche Médicale  
 IMC Indice de masse corporelle

**K**

KLF4 Kruppel-like factor 4  
 KO Knockout

**L**

LMW Faible poids moléculaire  
 LPL Lipoprotein lipase

**M**

MAPK Mitogen-activated protein kinase  
 MET Metabolic equivalent of task  
 MHC- $\alpha$  Protéine  $\alpha$ -myosin heavy chain  
 miARN/miR microARN  
 MMW Moyen poids moléculaire  
 mnSOD Superoxyde dismutase manganèse  
 MOSPA-Q MONICA Optional study of  
 physical activity questionnaire  
 Myf5 Myogenic factor 5  
 MRF4 Myogenic regulatory factor 4  
 mtGAPT Mitochondrial glycerol-3-  
 phosphate acyltransferase  
 mTOR Mammalian target of rapamycin  
 MyoD Myogenic differentiation 1

**N**

NA Normo-pondérés actifs  
 NAFLD Stéato-hépatite non alcoolique  
 NAP Niveau d'activité physique  
 NASH Stéatose hépatique non alcoolique  
 NEFA Non-esterified fatty acids  
 NFAT Nuclear factor of activated T-cells  
 NF- $\kappa$ B nuclear factor-kappa B  
 NRAS Neuroblastoma RAS viral oncogene  
 homolog  
 NRF1 Nuclear respiratory factor 1  
 NS Normo-pondérés inactifs

**O**

OMS Organisation Mondiale de la Santé  
 ORFs Opening reading frame  
 OS Inactifs en surpoids

**P**

PACT Protein activator of the interferon-  
 induced protein kinase  
 PBS Phosphate-buffered saline  
 PCR Polymerase chain reaction  
 PDK4 Pyruvate dehydrogenase lipoamide  
 kinase isozyme 4  
 PGC-1 $\alpha$  Peroxisome proliferator-activated  
 receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$   
 PI3K Phosphoinositide 3-kinase

PITX3 Paired-like homeodomain 3  
 PKB Protéine kinase B  
 PPAR Peroxisome proliferator-activated  
 receptor  
 PPARGC1 $\alpha$  Peroxisome proliferator-  
 activated receptor gamma coactivator 1-  
 alpha

pre-miARN Précurseur des microARNs  
 pri-miARN Transcrit primaire des  
 microARNs

PRKAA2 Protein kinase, AMP-activated,  
 alpha 2 catalytic subunit  
 PTEN Phosphatase and tensin homolog

**R**

Rab5 Ras-related protein  
 RBP Facteurs de dégradation  
 RHD N-terminal homologue Rel  
 RISC RNA induced silencing complex  
 ROCK1 Rho-Associated, Coiled-Coil  
 Containing Protein Kinase 1  
 RT Transcriptase reverse  
 RT-qPCR PCR quantitative en temps réel

**S**

SDS Sodium deoxycholate  
 SED Absence d'exercice  
 shARNs Short hairpin RNA  
 snoARNs Small nucleolar RNA  
 SPTLC1 Serine palmitoyltransferase, long  
 chain base subunit 1  
 SREBP Sterol regulatory element-binding  
 protein  
 SRF Serum-response-factor  
 SVF $\delta$  Serum de veau fœtal décomplémenté  
 S1P Sphingosine-1-phosphate

**T**

TLDA, TaqMan Low Density Array  
 TNF $\alpha$  Tumor necrosis factor  
 TRBP Transactivation response RNA-  
 binding protein

**V**

VEGF Vascular endothelial growth factor  
 VO<sub>2max</sub> Capacité cardiorespiratoire

**W**

WHO Organisation Mondiale de la Santé  
 WL2 wheel-lock 2 semaines  
 WL4 wheel-lock 4 semaines

**X**

XRN1 5'-3' Exoribonuclease 1

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1.	Courbe dose-réponse entre activité physique et les bénéfices sur la santé.	35
Figure 2.	Utilisation des trois systèmes énergétiques lors d'activité de durées et d'intensités différentes.	39
Figure 3.	Voies de signalisation impliquées lors de la contraction musculaire au cours d'un effort physique	40
Figure 4.	Utilisation des substrats par le muscle lors de l'effort physique.	41
Figure 5.	Polymérisation de l'adiponectine.	48
Figure 6.	Structure du promoteur du gène humain de l'adiponectine.	50
Figure 7.	Voies de signalisation impliquée dans le contrôle de la régulation de la transcription de l'adiponectine.	51
Figure 8.	Diversité des tissus cibles de l'adiponectine.	54
Figure 9.	Structure, répartition tissulaire et voies de signalisation des récepteurs AdipoR1, AdipoR2 et T-Cadherin de l'adiponectine.	57
Figure 10.	Principales voies de signalisation de l'adiponectine.	61
Figure 11.	Augmentation exponentielle du nombre de travaux de recherches sur les microARNs.	74
Figure 12.	Organisation génomique des microARNs.	76
Figure 13.	Biosynthèse des microARNs introniques à distribution mixte.	77
Figure 14.	Représentation schématique des voies de synthèses canonique et non canonique des microARNs.	78
Figure 15.	Boucles de rétrocontrôle de l'expression des microARNs.	82
Figure 16.	Réseau de régulation des ARNm cibles par les microARNs.	85
Figure 17.	Mécanismes de régulation post-transcriptionnel des gènes par les microARNs chez les eucaryotes.	87
Figure 18.	Figure synoptique des principaux objectifs développés dans la thèse.	
Figure 19.	Déroulement du protocole d'alitement prolongé, bed-rest.	105
Figure 20.	Déroulement de l'étude LIPOX.	110
Figure 21.	Déroulement de l'étude SEDENT.	113
Figure 22.	Construction des adénovirus recombinant pour miR-148b et miR-21.	118
Figure 23.	Adaptation du protocole d'extraction des ARNs totaux au TriReagent, pour l'extraction des microARNs dans le sérum.	124
Figure 24.	Principe de la PCR quantitative en temps réel basée sur l'utilisation de l'intercalant SybrGreen.	126
Figure 25.	Cinétique de PCR en temps réel, selon une échelle linéaire à gauche et logarithmique à droite.	126
Figure 26.	Principe de la PCR quantitative en temps réel basée sur les sondes TaqMan.	128
Figure 27.	Schéma de la méthode de Vandesompele et al. (2002). Exemple de calcul du facteur de stabilité M pour un microARN (mir n°1).	130
Figure 28.	Associations entre les paramètres métaboliques et les concentrations plasmatiques des microARNs chez les sujets de l'étude LIPOX	182
Figure 29.	Taux circulants de miR-148b dans le plasma des sujets de LIPOX.	183
Figure 30.	Taux circulants de miR-148b dans le plasma de sujets de sexe masculin en bonne santé issus de divers protocoles.	184
Figure 31.	Principe du stockage ectopique des graisses.	235
Figure 32.	Implication de l'adiponectine et de miR-148b dans les mécanismes sous-jacents des altérations métaboliques induites par l'inactivité	242

# TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Critères d'inclusion et d'exclusion des sujets de l'étude LIPOX.	107
Tableau 2. Caractéristiques des kits ELISA de mesure de l'adiponectine utilisés dans l'étude LIPOX selon les procédures des fournisseurs.	111
Tableau 3. Référence de la séquence mimic 39 de <i>Caenorhabditis Elegans</i> et des amorces pour RT et qPCR TaqMan	124
Tableau 4. Réactifs utilisés pour la technologie TaqMan	127

# COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES

## Journée Scientifique des doctorants de CarMeN

Villeurbanne, France

9 septembre 2013

*Présentation orale : " Les microARNs : des marqueurs sériques d'activité/ sédentarité ?"*

---

## Assises de Nutrition et Métabolisme

Saint-Galmier, France

16-17 octobre 2013

*Présentation orale : "Le microARN : un acteur essentiel de la relation sédentarité/santé ?"*

---

## Journée Scientifique de l'école doctorale Interdisciplinaire

### Sciences-Santé EDISS

Villeurbanne, France

16 octobre 2014

*Présentation orale : "Under body weight clamp, serum adiponectin is inversely associated with physical activity"*

---

## Réunion Scientifique de l'Association Française d'Etude et de

### Recherche sur l'Obésité

Nantes, France

15-16 Janvier 2015

*Présentation poster : "Etude de miR-148b et miR-21 dans les effets induits par l'activité physique"*

---

## Congrès de la Société Francophone du Diabète

Bordeaux, France

24-27 mars 2015

*Présentation orale : " Implication de miR-148b dans la réponse musculaire à l'activité et à l'inactivité physiques"*

# PUBLICATIONS

## **Circulating MiRNAs of 'Asian Indian Phenotype' Identified in Subjects with Impaired Glucose Tolerance and Patients with Type 2 Diabetes**

Paramasivam Prabu, Sophie Rome, Chandrakumar Sathishkumar, Sankaramoorthy Aravind, Balakumar Mahalingam, Coimbatore Subramanian, **Caroline Gastebois**, Audrey Villard, Viswanathan Mohan, Muthuswamy Balasubramanyam

PLoS One 10(5), DOI: 10.1371, Mai 2015

---

## **Effect of enforced physical inactivity induced by 60-d of bed rest on hepatic markers of NAFLD in healthy normal-weight women**

Floriane Rudwill, Audrey Bergouignan, **Caroline Gastebois**, Guillemette Gauquelin-Koch, Etienne Lefai, Stéphane Blanc and Chantal Simon

Liver International 35(6), 1700–1706, Juin 2015

---

## **Early Transition from active to sedentary promotes mir-148b expression in muscle and triggers metabolic alterations**

**Caroline Gastebois**, Stéphanie Chanon, Sophie Rome, Audrey Jalabert, Vanessa Euthine, Christine Durand, Vincent Pialoux, Stéphane Blanc, Chantal Simon et Etienne Lefai

Soumis : Cell Communication and Signalling

---

## **Effects of training and detraining on adiponectin plasma concentrations and muscle adiponectin sensitivity in lean and overweight men**

**Caroline Gastebois**, Clément Villars, Jocelyne Draï, Emmanuelle Canet-Soulas, Stéphane Blanc, Audrey Bergouignan, Etienne Lefai et Chantal Simon

Soumis : European Journal of Applied Physiology





# PREAMBULE

Les changements actuels de mode de vie, notamment la diminution de l'activité physique au quotidien, sont associés aux maladies chroniques, alors qu'une activité régulière améliore les fonctions métaboliques. La pratique d'une activité physique régulière et adaptée réduit ainsi le risque global de mortalité et le risque de nombreuses maladies chroniques, telles que le diabète de type 2 et ses risques associés, les maladies cardiovasculaires et coronariennes, l'hypertension artérielle et le risque de certains cancers. A l'inverse, l'inactivité physique est notamment considérée comme le quatrième facteur de risque de mortalité. Parmi les altérations induites par l'inactivité, on peut citer la présence d'une inflammation de bas niveau, le développement d'une résistance à l'insuline, une diminution de l'oxydation des lipides ainsi qu'une hypertriglycémie. L'ensemble de ces altérations contribue au développement du stockage ectopique des lipides et à un stade plus avancé, au syndrome métabolique.

La relation entre activité et inactivité physique et santé n'est pas encore totalement élucidée. En effet, une grande partie des connaissances repose sur des études épidémiologiques centrées sur les effets de l'exercice, qui représente qu'une faible part de l'activité physique quotidienne, sur la santé. Les effets bénéfiques de l'activité physique, et délétères de l'inactivité physique, ayant des effets à l'échelle corps entier, n'impliquent pas seulement le muscle, mais également d'autres tissus mettant en jeu un dialogue inter-organe ou cross-talk.

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de thèse. Je me suis intéressée aux effets de l'activité et inactivité physique modérée et inactivité extrême au-delà de l'exercice, afin d'aborder les effets de l'activité physique quotidienne, sur le muscle mais aussi sur d'autres organes, tels que le foie, et sur des acteurs du cross-talk, l'adiponectine étant issue du tissu adipeux et les microARNs. Nous avons tout d'abord rétrospectivement étudié les effets de l'inactivité physique sévère sur le foie, un organe périphérique pouvant être impliqué dans les altérations du métabolisme en réponse à l'inactivité. L'évolution de marqueurs du développement d'une stéato-hépatite non alcoolique (NAFLD), indépendamment des variations de

balance énergétique maintenue stable durant le protocole, a ainsi été examinée dans un protocole d'alitement prolongé. En parallèle, les effets d'un entraînement combinant exercice aérobie et en résistance, comme contre-mesure de ce protocole d'inactivité sévère induite ont également été examinés.

L'adiponectine est une hormone du tissu adipeux qui possède des propriétés anti-inflammatoires et anti-athérogéniques, et est impliquée dans l'homéostasie glucidique, des effets comparables à ceux de l'activité physique. De plus, la sécrétion de l'adiponectine est diminuée dans l'obésité et dans différentes situations d'insulino-résistance. L'implication de l'adiponectine comme acteur du cross-talk de l'activité physique a été suggérée, cependant les effets de l'activité physique sur l'adiponectine présentent des résultats contradictoires dans la littérature. Le second objectif de ce travail de thèse a donc été d'évaluer les effets de l'activité et inactivité physique *per se* sur la concentration plasmatique en adiponectine, indépendamment des effets que peut avoir l'activité physique sur la composition corporelle. Les différentes formes circulantes d'adiponectine, ses récepteurs dans le muscle, et l'expression de l'adiponectine dans le tissu adipeux et le muscle ont été évalués dans l'entraînement et le désentraînement de sujets respectivement inactifs et actifs (protocole LIPOX).

Enfin, l'implication des microARNs, d'importants régulateurs de l'expression des gènes récemment identifiés, dans les mécanismes sous-jacents de l'activité et inactivité physique a été étudiée, dans le protocole LIPOX, où les niveaux d'activité physique sont bien caractérisés et la balance énergétique a été maintenue stable. Parmi les microARNs identifiés, l'implication de miR-148b dans l'inactivité physique, et plus précisément dans la transition vers l'inactivité a également été explorée dans un protocole de désentraînement chez la souris. Le rôle de miR-148b dans les effets biologiques de l'inactivité physique a ensuite été étudié plus en détail *in vitro* dans des cellules primaires musculaires différenciées humaines.

Dans un premier chapitre, une synthèse de la littérature est proposée : une première partie aborde les notions d'activité et inactivité physique, et comportements sédentaires, et leurs déterminants, ainsi que leurs liens avec la santé ; une deuxième partie présente l'adiponectine et ses variations avec l'activité physique ; et enfin une dernière partie concerne les microARNs et leurs liens avec l'activité physique. Les matériels et méthodes utilisés dans ce travail de thèse font l'objet du deuxième chapitre. Les résultats seront ensuite présentés dans le chapitre 3 sous la forme de trois communications écrites : la première concerne les

marqueurs hépatiques dans le protocole d'alitement prolongé, la deuxième les effets d'une intervention physique modérée contrastée sur l'adiponectine indépendamment des variations de composition corporelle, et enfin la dernière concerne l'implication de miR-148b dans la transition d'une induction d'inactivité modérée. Enfin dans le dernier chapitre, les résultats seront discutés et des perspectives seront développées.



# INTRODUCTION



## I. Exercice, Sédentarité et Santé

### A. Exercice, Sédentarité et Santé – Perspective historique

*« Chez l'homme, le manque d'activité physique détruit la bonne condition, alors que le mouvement et l'exercice physique méthodique la préservent. »*

Platon (427-348 avant J.C.)

Les effets bénéfiques de l'activité physique sur la santé, notamment en prévention des maladies sont suggérées depuis l'Antiquité. Hippocrate nous apprend que *« Toutes les parties du corps qui remplissent une fonction sont saines, bien développées et vieillissent plus lentement si elles sont sollicitées avec mesure et exercées à des travaux dont on a l'habitude. Mais si elles ne sont pas utilisées et sont indolentes, elles tendent à devenir malades, se développent mal et vieillissent prématurément »*, et de ce fait, préconisait déjà une pratique régulière et adaptée de l'activité physique. Dans la lignée, Galien suit la tradition d'Hippocrate, et apporte ses propres contributions à la médecine, en structurant sa théorie médicale autour des choses « naturelles », « non-naturelles » et « contre-nature » (Berryman 1989). Au centre de cette théorie, on trouve la santé, et les utilisations et abus de « six choses non-naturelles » que sont l'air, le régime alimentaire, le sommeil et la veille, l'exercice et le repos, les excréments et rétentions, et les passions de l'esprit (la joie, la tristesse, la peur et la colère). Leur pratique équilibrée maintient une bonne santé et à l'inverse, tout déséquilibre (absence ou excès) conduit à un état pathologique. Parmi ces six catégories de comportements permettant de contrôler sa santé, on peut souligner l'exercice que préconisait Galien pour soigner des troubles ou maladies telles que l'arthrite, la dépression, les œdèmes, l'épilepsie, la goutte, la tuberculose ou les vertiges (Tipton 2014). Les travaux de Galien, traduits au XI<sup>e</sup> siècle par des intellectuels arabes, ont régné sur la médecine jusqu'à la Renaissance. Ainsi, l'exercice était recommandé en prévention et pour diminuer les conséquences des maladies jusqu'au début du XVI<sup>e</sup> siècle. Bien que la théorie de Galien soit par la suite remplacée par de nouvelles idées, notamment l'anatomie et la physiologie, les exemples de recommandations de l'exercice pour garder une bonne santé abonde dans la littérature médicale. Ainsi, le docteur Francis Fuller au début du XVIII<sup>e</sup> siècle, les docteurs William Bunchan et Clément Tissot à la fin du XVIII<sup>e</sup> siècle, ou encore le docteur Shadrach Ricketson au début du XIX<sup>e</sup> siècle



mettent en avant l'importance de l'exercice pour prévenir ou guérir (Berryman 2010).

Au cours du XIX<sup>e</sup> siècle, le développement de la santé publique et de l'hygiénisme, appuyé notamment sur les découvertes de Louis Pasteur, sera également accompagné par le renforcement du recours aux exercices à des fins hygiéniques (Attali and Saint-Martin 2010). Ainsi, le physiologiste Fernand Lagrange s'évertuait à faire de l'exercice et des jeux en pleins air un véritable remède. Mais ce n'est que plus-tard, au XX<sup>e</sup> siècle, que les intuitions d'un intérêt de l'activité physique pour la santé ont commencé à être étayées scientifiquement. On peut ainsi citer les recherches avant-gardistes menées sur l'exercice au Harvard Fatigue Laboratory dans les années 30 et 40 considéré comme à l'origine de la recherche en physiologie de l'exercice aux Etats-Unis, ou le rôle majeur du Cureton Fitness Laboratory dans le développement des méthodes de mesure des performances physiques à la fin des années 40 et années 50 (Berryman 2010). A l'après-guerre, les travaux de Jerry Morris, un épidémiologiste écossais, ont permis pour la première fois de mettre en évidence un lien entre inactivité physique et plusieurs maladies chroniques, notamment les maladies cardiovasculaires (Morris 1955). En 1961, la publication du livre *Hypokinetic Disease* par Hans Kraus et Wilhelm Raab, que beaucoup considèrent comme une publication de référence montrant les liens entre inactivité physique et santé, a contribué à populariser les bienfaits de l'exercice et favoriser l'étude des problèmes de santé associés à l'inactivité physique.

L'intérêt croissant au XX<sup>e</sup> siècle pour le lien entre inactivité physique et santé va de pair avec la diminution progressive de la quantité moyenne d'activité physique des populations et l'augmentation parallèle des maladies chroniques, induites par l'évolution des modes de vie, notamment dans les pays industrialisés où le développement des nouvelles technologies permet de réaliser diverses tâches avec une très faible dépense d'énergie corporelle. Cet abandon progressif de la dépense énergétique qui a lieu aussi bien dans les activités professionnelles que dans la vie courante, tend à diminuer la stimulation physique nécessaire au bon équilibre et à la santé. Ainsi derrière les enseignements des philosophes de l'antiquité, une théorie évolutionniste a émergé indiquant que l'homme a hérité d'un génome programmé pour l'activité physique quand celle-ci était obligatoire pour la survie (Booth et al. 2002). Dans cette même logique, en association avec une alimentation inadaptée, le manque d'activité physique, nécessaire au maintien d'une signalisation normale des voies cellulaires, entraînerait ainsi un décalage

entre le génome et les besoins de l'individu à l'origine du développement de nombreuses maladies chroniques (Booth et al. 2002).

Les connaissances sur les effets de l'activité physique sur la mortalité, le bien-être et la qualité de vie, en lien avec diverses pathologies ont fait l'objet de plusieurs rapports d'expertise, notamment par le département des services de la Santé et des Services sociaux des Etats-Unis en 1996 (HHS 1996) et par l'Inserm en 2008 (Inserm 2008). Comme on peut le voir dans ces rapports, les preuves de l'intérêt de l'exercice pour la santé sont importantes.

Si les effets de l'exercice et d'un niveau d'activité physique élevé sont aujourd'hui bien établis, des interrogations persistent concernant le niveau minimal d'activité physique et le type d'activité nécessaires pour avoir un effet sur la santé. En effet, bien que ce soit surtout l'activité dans le quotidien et au travail qui ait diminué, les recommandations de santé publique actuelles sont principalement basées sur des études en physiologie et épidémiologie de l'exercice, et non de l'activité au sens large. En ce début de XXIème siècle, des travaux suggèrent que l'activité physique non liée à l'exercice et le temps passé assis pourraient avoir des effets propres – positifs et négatifs respectivement – complémentaires de ceux de l'exercice.

## B. Terminologie

### 1. *Activité physique et exercice*

D'après Caspersen et al. (1985), l'activité physique se définit comme tout mouvement corporel induit par les muscles squelettiques produisant une dépense énergétique faible ou élevée, contribuant ainsi à une augmentation de la dépense d'énergie au-dessus de la dépense de repos. Il précise aussi que si l'activité physique est positivement corrélée à la condition physique, celle-ci est une notion distincte et correspond à la résultante à un moment donné de l'état des qualités physiques d'un individu (aptitude physique). La condition et l'aptitude physiques dépendent en partie du niveau d'activité physique d'un individu mais également de caractéristiques qui lui sont propres, notamment génétiques.

L'activité physique est une entité large qui ne se limite pas aux activités de loisirs, et encore moins à l'exercice ou au sport mais englobe tous les mouvements réalisés dans la vie quotidienne (HHS 1996). Elle peut être réalisée dans différents contextes :

- Les loisirs : incluant l'exercice, l'entraînement physique, le sport, la compétition mais aussi des activités plus douces telles que la marche ou le yoga. L'exercice se caractérise par tout mouvement corporel planifié, structuré et répétitif accompli pour améliorer ou entretenir une ou plusieurs composantes de la condition physique (Caspersen et al. 1985). Le sport est également un sous-ensemble de l'activité physique et se définit par des activités physiques et sportives organisées au sein d'institutions qui impliquent de la compétition, des enjeux et des règlements (Attali and Saint-Martin 2010). Selon les pays, le terme sport est utilisé pour inclure les exercices et les activités de loisirs plus douces, incluant notamment la marche pour le plaisir.
- L'activité physique liée à la vie professionnelle ou aux occupations principales (écoles, associations...). Aujourd'hui, certaines activités professionnelles où le temps passé assis est élevé sont caractérisées par une dépense énergétique faible.
- Les activités domestiques, comme les activités ménagères, la préparation des repas ou la toilette, constituent également une part de la dépense énergétique liée à l'activité.
- L'activité liée au transport actif, notamment pour se rendre au travail ou à l'école ou à d'autres fins utilitaires. Ce type d'activité physique est aujourd'hui considéré comme primordial à la fois parce qu'il s'est considérablement réduit ces dernières décennies mais aussi parce qu'il représente une possibilité importante d'augmentation de la dépense énergétique liée à l'activité physique.

## 2. *Inactivité physique et sédentarité*

En raison de l'évolution des modes de vie et de la diminution progressive de la quantité moyenne d'activité physique des populations, les comportements inactifs et sédentaires ont augmentés.

L'inactivité physique fait le plus souvent référence à un niveau d'activité physique insuffisant pour atteindre les recommandations d'activité physique, *i.e.* 150 min par semaine (ou 30 min par jour 5 fois par semaine) d'activité physique modérée à intense (WHO 2010) et considérées comme une référence pour les effets « santé » de l'activité physique. A titre d'exemple ce critère simple a été utilisé dans une étude transversale menée par Elley et al. (2003). Sur 2984 patients à qui les auteurs ont simplement demandé s'ils pratiquaient une heure et demie d'activité physique modérée à vigoureuse par semaine, 46% (n=1364) ont répondu « non » et ont été alors considérés comme physiquement inactifs. Les auteurs ont pu montrer

que cette simple question avait permis de classer correctement les sujets en actif/inactif en comparaison avec un questionnaire plus complet (le Auckland Heart Study (AHS) 3-month recall physical activity questionnaire) et que le statut inactif ainsi identifié était associé à une prévalence accrue de maladies chroniques, comme l'hypertension (52%), le diabète (10,5%), l'obésité (43%), et les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires (93%).

En 2010, au niveau mondial, 23% des adultes âgés de 18 ans et plus n'atteignaient pas les recommandations d'activité physique et étaient considérés alors comme inactifs (WHO 2010). Les femmes (27%) sont moins souvent actives que les hommes (20%). L'inactivité physique augmente avec l'âge, atteignant plus de la moitié des individus chez les plus âgés. L'inactivité physique est également associée avec le niveau de revenu du pays, la prévalence étant doublée dans les pays à fort revenus (33%) par rapport aux pays à faible revenus (17%) (WHO 2010).

La sédentarité (du latin *sedere*, être assis) est à distinguer de l'inactivité physique, bien que les différences n'aient pas toujours été bien identifiées dans la littérature (Dietz 1996; Bernstein et al. 1999). La sédentarité peut ainsi se définir comme un ensemble de comportements au cours desquels la position assise ou couchée est dominante et pour lesquels la dépense énergétique est proche de celle de repos ( $\leq 1,5$ METs) (Sedentary Behaviour Research 2012). Parmi les comportements dits sédentaires, on peut identifier le temps passé devant un écran (télévision, ordinateur), le temps passé à lire ou écrire, le temps passé assis, le temps passé allongé (sauf sommeil), ou le temps passé dans un véhicule (Rhodes et al. 2012). De nombreuses études utilisent aujourd'hui, de façon restrictive, le temps passé devant un écran (tous types confondus) comme un indicateur de la sédentarité.

Il est important de souligner que la sédentarité n'est pas le miroir de l'activité physique (au sens des recommandations tout au moins). En effet, de nombreux travaux soulignent que l'activité physique modérée à intense (ou l'exercice) et le comportement sédentaire sont deux comportements distincts qui peuvent coexister chez les mêmes individus (Owen et al. 2010) et qui ont des effets indépendants sur la santé (Thorp et al. 2011). Certains travaux récents suggèrent fortement que les mécanismes biologiques sous-tendant les effets de l'activité physique et de la

sédentarité (au sens temps passé assis) pourraient également être distincts (Simonen et al. 2003).

### C. Les caractéristiques de l'activité physique

L'activité physique se caractérise selon plusieurs éléments : son type (quelle activité physique), sa durée (pendant combien de temps), sa fréquence (quelle régularité et quel fractionnement), son intensité (quel investissement physique et quelle dépense énergétique), et son contexte (quel environnement et condition sociale) (Inserm 2008).

On distingue généralement trois types d'activité physique, selon leur effet global sur le corps humain (HHS 2006): aérobie (endurance), anaérobie (résistance) et souplesse (équilibre). Le type aérobie, fait référence à des exercices d'intensité moyenne et de longue durée améliorant l'endurance cardiovasculaire, comme le cyclisme ou la marche. Le type anaérobie est typiquement des activités d'intensité élevée généralement brèves qui visent à augmenter la force et la masse musculaire, comme la musculation. Enfin les exercices de souplesse ou de flexibilité, comme les étirements, favorise l'équilibre via l'amélioration de la mobilité des muscles et des articulations.

*L'intensité* de l'activité physique peut s'exprimer en valeur absolue, *i.e.* la dépense énergétique induite par l'activité physique pendant une durée spécifique de temps, ou rapportée au poids corporel ou plus communément au métabolisme de repos (MET, metabolic equivalent of task). Elle peut également être exprimée en proportion de la performance maximale de l'individu, par exemple en pourcentage de la capacité cardio-respiratoire maximale  $VO_{2max}$ , ou de la fréquence cardiaque maximale  $FC_{max}$ . Le MET équivaut à l'intensité « minimale » correspondant à une consommation d'oxygène de repos de l'ordre de 3,5 mL $O_2$ /kg/min ou 1 kcal/kg/h. Ainsi, chaque activité peut être associée à une dépense énergétique exprimée en multiple de MET (Ainsworth et al. 1993). D'après le modèle proposé par Pate et al. (1995), une activité inférieure à 3 METs est légère, comprise entre 3 et 6 METs est modérée et supérieure à 6 METs est intense (soutenue). Les comportements sédentaires quant à eux correspondent à des activités situées entre l'absence de mouvement et les activités d'intensité très faible, générant ainsi une dépense énergétique inférieure à 1,5 METs (Rhodes et al. 2012) et réalisés en position assise.

*La fréquence et la durée* déterminent le fractionnement de l'activité. La durée de l'activité physique fait référence au temps consacré lors d'une seule session d'activité physique. La fréquence correspond au nombre de session d'activité physique pendant une période définie dans le temps, et permet ainsi d'observer la régularité de la pratique (Wilmore et al. 2009). Dans une revue systémique sur les effets du fractionnement de l'exercice, Hardman (2001) rapporte que plusieurs sessions courtes d'exercice cumulées ont le même effet bénéfique qu'une longue session de même durée, pour autant que les sessions aient une durée minimale. Il est aujourd'hui admis que le volume total d'activité (plus que sa durée et son intensité) est déterminant pour la santé. Il faut toutefois préciser que dans le cadre des recommandations actuelles, seules les activités d'intensité au moins modérées et d'une durée d'au moins 10 minutes sont à prendre en compte.

Il est important de souligner que les caractéristiques de l'activité physique qui permettent d'obtenir des effets sur la santé diffèrent très probablement selon les paramètres étudiés : cardiovasculaire, balance énergétique, ou encore métabolique. Ainsi pour des activités physiques induisant une dépense énergétique équivalente, mais différente de par leur intensité, leur durée ou leur fréquence, peuvent avoir des effets physiologiques différents selon les paramètres de santé considérés. Initialement, dans les années 1980, les recommandations en matière d'activité physique étaient de trois séances de 20 minutes par semaine d'exercice intense, et de ce fait étaient centrées sur la performance et la capacité cardiorespiratoire, nécessitant probablement des intensités importantes. Les effets dépendant des caractéristiques de l'activité physique et des paramètres de santé à améliorer, dans une perspective de santé publique visant à toucher le plus grand nombre d'individus, les recommandations ont évolué dans les années 1990 en incluant les activités modérées et le fractionnement de l'activité.

La notion de *contexte* est également importante dans la caractérisation de l'activité physique, notamment les aspects sociaux et environnementaux, dans une perspective de promotion de la pratique d'activité physique, dans toutes ses composantes et tout au long de la journée.

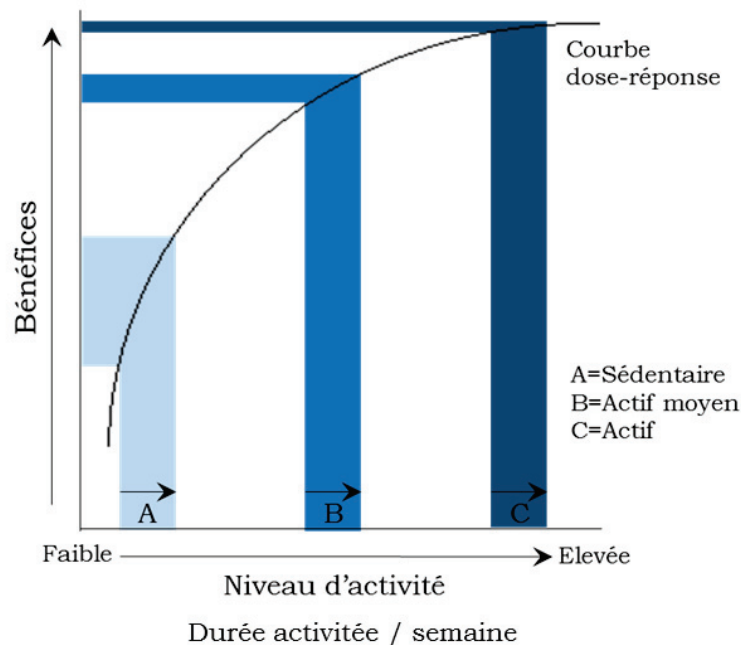
#### D. Effets de l'activité physique, de l'inactivité physique et de la sédentarité sur la santé

Suggérées dès l'antiquité puis appuyées scientifiquement, les effets bénéfiques de l'activité physique sur la santé sont aujourd'hui admis de tous. La pratique d'une activité physique régulière et adaptée réduit le risque global de mortalité, le risque des principales maladies chroniques, telles que les maladies cardiovasculaires et coronariennes (Lavie et al. 2015), le diabète de type 2 et ses risques associés (Sigal et al. 2006), l'hypertension artérielle (Semlitsch et al. 2013), ou encore le risque de certains cancers, tels que les cancers du sein ou le cancer du côlon (Wiseman 2008; Goncalves et al. 2014). L'activité physique étant un déterminant clé de la dépense énergétique, elle est fondamentale pour l'équilibre énergétique et participe ainsi au contrôle du poids (Caudwell et al. 2014). L'activité physique prévient également l'ostéoporose, en améliorant notamment la masse et la résistance des os, et diminue le risque de chute chez les personnes âgées (Carter and Hinton 2014). Enfin, l'activité physique améliore la qualité de vie et la santé mentale, en favorisant l'estime de soi et le bien-être émotionnel perçu et en réduisant le stress et l'anxiété et ainsi les risques de dépression (Zschucke et al. 2013).

A l'inverse, l'inactivité physique augmente les risques de nombreuses maladies chroniques et de ce fait est devenue un enjeu de santé publique majeur de ce XXIème siècle. L'inactivité physique est notamment considérée comme le quatrième facteur de risque de mortalité (6% des décès), après l'hypertension artérielle (13%), le tabagisme (9%) et l'hyperglycémie chronique (6%) (Organization 2009). Le nombre de décès dans le monde lié à l'inactivité physique est en augmentation passant de 1,9 millions en 2004 à 5,3 millions en 2008 (Lee et al. 2012). L'inactivité physique est estimée par ailleurs comme responsable de 21 à 25% des cancers du sein ou du colon, de 27% des cas de diabète et d'environ 30% des cas de cardiopathie ischémique (Organization 2009).

Globalement la relation existant entre le volume d'activité physique et les bénéfices sur la santé suit une courbe dose-réponse (Figure 1). Lorsque le niveau d'activité physique augmente, les bénéfices pour la santé dépendent du niveau initial d'activité physique, *i.e.* les bénéfices liés à l'augmentation de l'activité physique sont plus grands chez les individus sédentaires. Comme mentionné précédemment, la pratique d'une activité physique régulière est positivement corrélée à de nombreux paramètres de santé, mais il est maintenant établi que la reprise d'activité physique modérée à intense améliore ces paramètres en comparaison à des individus qui restent sédentaires (Bouchard 2001). Comme le

montre la courbe dose-réponse, le gain le plus important est obtenu chez des sujets inactifs devenant progressivement actifs (A). Un bénéfice supplémentaire est également obtenu chez sujets déjà modérément actifs qui augmentent leur pratique (B). Ainsi, une augmentation du niveau physique, même si elle est minime peut avoir des effets bénéfiques significatifs sur la santé.



**Figure 1. Courbe dose-réponse entre activité physique et les bénéfices sur la santé.** Il existe une relation entre les bénéfices sur la santé et le volume d'activité physique (généralement exprimé en dépense énergétique liée à l'activité physique). De façon intéressante, les bénéfices associés à une augmentation d'activité physique seront d'autant plus grands que le niveau initial d'activité physique sera faible (flèches A, B et C).

*D'après Pate et al. (1995) et Boucard (2001)*

Les recommandations étaient initialement basées sur des études en physiologie et épidémiologie de l'exercice et étaient ainsi centrées sur des activités intenses de courtes durées. Or les activités d'intensité élevée, de type exercice, représentent seulement 1% du temps moyen éveillé d'un adulte (15h). Les recommandations actuelles ont évolué pour inclure également les exercices modérés mais cela ne représente toujours que 3% du temps éveillé. En effet, un adulte passe plus de la moitié de son temps éveillé assis, et plus du tiers dans des activités non liées à l'exercice (travail, transport, tâches quotidiennes...). D'une part, les activités de la vie quotidienne même d'intensité légère, comme le transport actif, sont associées à la santé (Wagner et al. 2001). D'autre part, les activités physiques non liées à l'exercice représentent une part majeure de la dépense énergétique, qui représente une fonction directe de l'effet de l'activité physique sur la santé (Hamilton et al. 2007). Elles représentent ainsi une possibilité importante



d'augmentation de la dépense énergétique qu'il est utile de prendre en compte dans les recommandations en matière d'activité physique.

Par ailleurs, la sédentarité étant un comportement distinct du niveau d'activité physique, plusieurs études épidémiologiques se sont intéressées aux effets négatifs des comportements sédentaires indépendamment des effets de l'exercice et de l'activité physique sur la santé. Des données concordantes publiées ces dernières années indiquent que les comportements sédentaires sont associés, indépendamment du niveau habituel d'activité physique (modérée à intense), à une augmentation des risques de prise pondérale, de développement de maladies chroniques telles que le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires, ou encore certains cancers (féminins, colorectal...), et à une augmentation de la mortalité cardiovasculaire, par cancer et totale (Thorp et al. 2011; Wilmot et al. 2012; Biswas et al. 2015). D'après une méta-analyse canadienne de 2015 portant sur 41 études (Biswas et al. 2015), un temps de sédentarité élevé est associé à une augmentation de 91% du risque de diabète, de 13% du risque de cancer et de 17% du risque de mortalité par cancer, de 14% du risque de maladies cardiovasculaires et de 18% du risque de mortalité cardiovasculaire, et de 24% du risque de mortalité totale en comparaison avec un temps de sédentarité faible (les niveaux de sédentarité étaient estimés de façon différente selon les études).

Bien plus, certaines études indiquent que les comportements sédentaires et l'inactivité physique augmentent de façon synergique les risques sur la santé. D'après la méta-analyse de Biswas et al. (2015), les risques relatifs des différentes pathologies étudiées et associés aux comportements sédentaires sont aggravés lorsque le niveau d'inactivité physique augmente. Par exemple, Bertrais et al. (2005) ont montré dans une analyse transversale que le risque de syndrome métabolique était plus élevé, pour un même temps passé assis devant l'écran, chez les femmes et les hommes sédentaires (niveau d'activité inférieur aux recommandations) en comparaison à leurs homologues actifs (niveau d'activité modéré ou intense).

#### E. Mécanismes biologiques sous-tendant les effets de l'activité physique et de la sédentarité sur la santé

##### *1. Protocoles d'étude*

L'étude des mécanismes sous-tendant les effets de l'activité physique et de la sédentarité sur la santé peut reposer sur des études prospectives, permettant

d'examiner les liens entre les niveaux d'activité et d'inactivité physique et de sédentarité, et les effets métaboliques globaux, ou des études interventionnelles dans lesquelles les niveaux d'activité, inactivité et sédentarité sont modifiés et les liens avec les paramètres métaboliques et les mécanismes biologiques impliqués sont explorés soit en chronique, soit en aigu.

Les effets physiologiques de l'activité physique pouvant être différents selon les caractéristiques de l'activité physique, comme l'intensité, la durée ou la fréquence, différents protocoles d'études existent. Les effets de l'activité physique en aigu ou de la pratique en chronique peuvent être examinés, ainsi que les effets de l'exercice en résistance ou d'endurance ou les deux combinés, ou encore les effets de la temporalité, tels que la durée, la fréquence des sessions ou la durée de l'entraînement, et enfin l'impact de l'intensité de l'activité physique. La pratique de l'activité physique en aigu engendre un stress dans l'organisme, qui met en place différentes adaptations physiologiques lorsque la pratique devient chronique. Ainsi, le choix du protocole est important en fonction des paramètres à étudier.

De façon plus récente différentes études se sont attachées à étudier les effets de l'inactivité physique, généralement induite par l'arrêt de toutes les activités structurées et une réduction de l'activité physique quotidienne non liée à l'exercice. Afin d'étudier l'inactivité sévère, les protocoles d'alitement prolongé (bed-rest), initialement mis au point pour simuler les conditions de la microgravité des vols spatiaux, peuvent également être utilisés. Dans ce type de protocole, les sujets sont allongés avec la tête en position déclive par rapport aux pieds (selon un angle de  $-6^\circ$  par rapport au plan horizontal), afin de reproduire au mieux les effets de la microgravité. Ces protocoles représentent de fait également un bon modèle d'inactivité extrême et de ses conséquences, notamment la diminution de la masse et de la force musculaire, de la densité osseuse ou encore de la sensibilité à l'insuline (Bergouignan et al. 2011).

## 2. *Mécanismes biologiques sous-jacents de l'activité et inactivité physique*

Comme on l'a vu précédemment, l'activité physique est associée à une diminution des risques des principales maladies métaboliques chroniques et cardiovasculaires. A l'échelle de l'organisme et de façon plus directe, la pratique d'une activité physique régulière est associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline, une plus grande capacité à oxyder les lipides mais aussi à des effets anti-inflammatoires et anti-athérogènes. Si les effets métaboliques bénéfiques de

l'activité physique sont principalement induits par son action sur le muscle via la contraction et le flux énergétique, de nombreuses études indiquent qu'elle impacte directement ou indirectement d'autres organes, notamment le foie. L'implication coordonnée d'autres tissus dans les effets de l'activité physique nécessite un véritable dialogue entre les organes, via notamment les myokines, les microARNs ou encore les adipokines, qui n'est toutefois qu'imparfaitement élucidé.

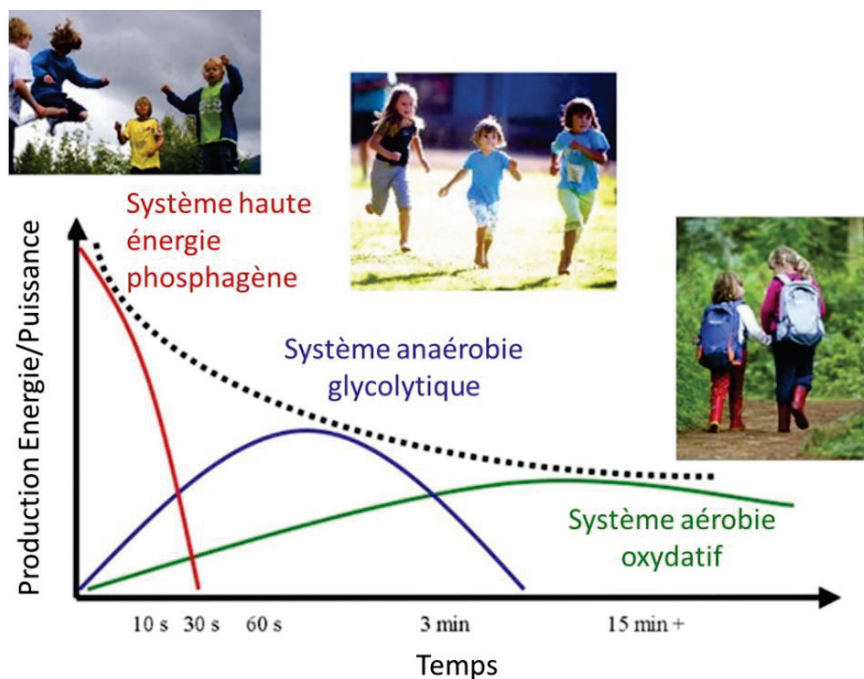
#### a. Le muscle squelettique

Le tissu musculaire représente en moyenne 40% du poids corporel d'un adulte de sexe masculin. Il est composé par une association de cellules musculaires différenciées, appelées myocytes, apportant différentes propriétés aux muscles, comme l'excitabilité, la contractilité ou l'élasticité, leur permettant de générer force et mouvement. Il existe trois types de tissu musculaire : le tissu squelettique qui constitue la plus grande partie de la masse musculaire (principalement dans les muscles moteurs), le tissu musculaire lisse (tuniques musculaires des viscères et des vaisseaux) et le tissu cardiaque (uniquement dans le myocarde). Le muscle squelettique assure les rôles de locomotion, de posture, mais intervient également dans la régulation de la température corporelle et impacte le métabolisme.

La contraction du muscle exige de l'énergie. Le muscle peut être comparé à une machine qui convertit de l'énergie chimique en travail mécanique. Les sources d'énergie utilisées par le muscle squelettique vont dépendre des caractéristiques de l'activité physique pratiquée, tels que le type, l'intensité ou encore la durée (Figure 2). Le système aérobie oxydatif, reposant sur l'oxydation du glycogène, du glucose ou des lipides, est utilisé pour des activités de longue durée et d'intensité faible à modérée. Le système anaérobie glycolytique, reposant sur la glycolyse anaérobie, est utilisé pour des activités de courte ou moyenne durée d'intensité élevée. Enfin le système haute énergie phosphagène, utilisant comme substrat de l'Adénosine Tri-Phosphate (ATP) ou de la phosphocréatine, est utilisé pour des activités de très courte durée et d'intensité élevée (Wells et al. 2009). Le rendement et l'efficacité de ces voies peuvent être améliorés par l'entraînement et à l'inverse être altérés par l'inactivité.

Le renouvellement des protéines musculaires représente environ 20 % du renouvellement protéique total, devant ceux de la peau et du tube digestif (15% chacun) et celui du foie (10%). Il joue un rôle essentiel dans la régulation de la masse musculaire et dans le maintien des capacités métaboliques et mécaniques du muscle. Le renouvellement protéique est basé sur deux phénomènes : la

synthèse et la dégradation protéique (protéolyse) qui agissent de façon simultanée et permettent de réguler finement le contenu protéique. Lorsque la synthèse protéique est supérieure à la protéolyse, on parle de gain protéique ou anabolisme protéique. A l'inverse, une protéolyse supérieure à la synthèse résulte en une diminution de la masse protéique, ou catabolisme protéique. Chez un adulte en bonne santé, la quantité de protéine synthétisée et dégradée par jour est à l'équilibre. En fonction de l'état physiologique (âge, nutrition, activité) ou pathologique (cancer, patient brûlé), cet équilibre peut être modifié et résulter en une augmentation ou en une diminution de la masse musculaire.



**Figure 2. Utilisation des trois systèmes énergétiques lors d'activité de durées et d'intensités différentes :** Au début d'une activité musculaire, le muscle est capable de mobiliser des réserves énergétiques importantes par le système « haute énergie phosphagène » sur de courtes durées. Pour des exercices de plus longues durées, le système anaérobie glycolytique fournit la majeure partie de l'énergie. Enfin pour que l'effort puisse être maintenu dans le temps, le système aérobie oxydatif est essentiel pour subvenir aux besoins énergétiques du muscle.

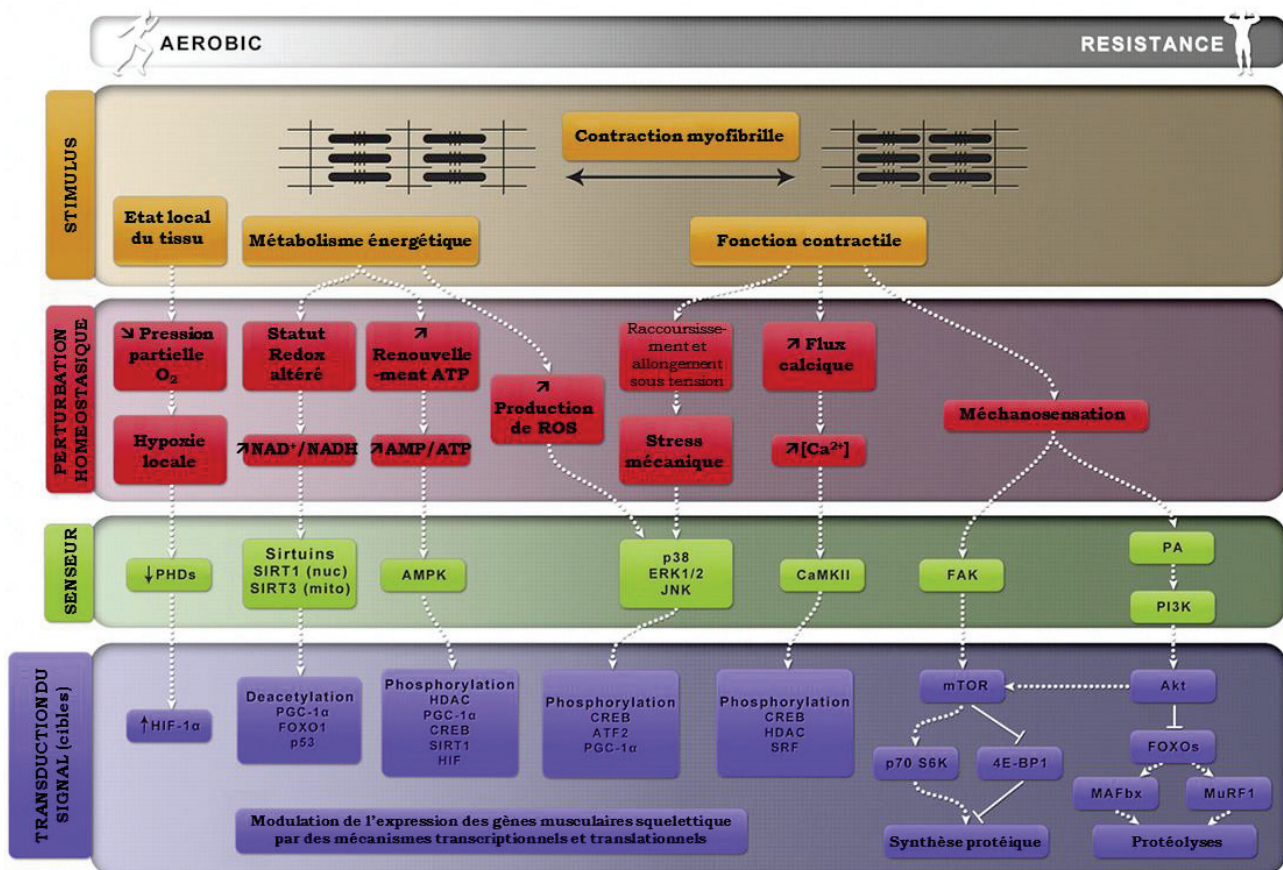
*D'après Wells et al. 2009*

La variation de masse du muscle squelettique, comme n'importe quel autre tissu, dépend du renouvellement des protéines (Sartorelli and Fulco 2004). Les protéines myofibrillaires représentent 85% du volume d'une fibre musculaire. Ainsi toutes les conditions physiologiques ou pathologiques modifiant l'équilibre de la balance protéique résulteront en une augmentation ou une diminution de la masse musculaire (Sartorelli and Fulco 2004; Sandri 2008). De ce fait, l'hypertrophie est la

résultante d'une balance protéique en faveur d'un gain protéique, et à l'inverse l'atrophie résulte d'une perte protéique nette.

Les protocoles d'inactivité extrême chez l'homme ont mis en évidence une perte de la masse musculaire, essentiellement dû à une diminution de la synthèse protéique, le système de dégradation étant inhibé (Symons et al. 2009; Bergouignan et al. 2011). Au niveau structural, l'inactivité physique réduit le nombre ou la taille des fibres musculaires lentes oxydatives (Adams et al. 2003), causes principales de l'atrophie musculaire et de la réduction de force qui en résulte (Hortobágyi et al. 2000).

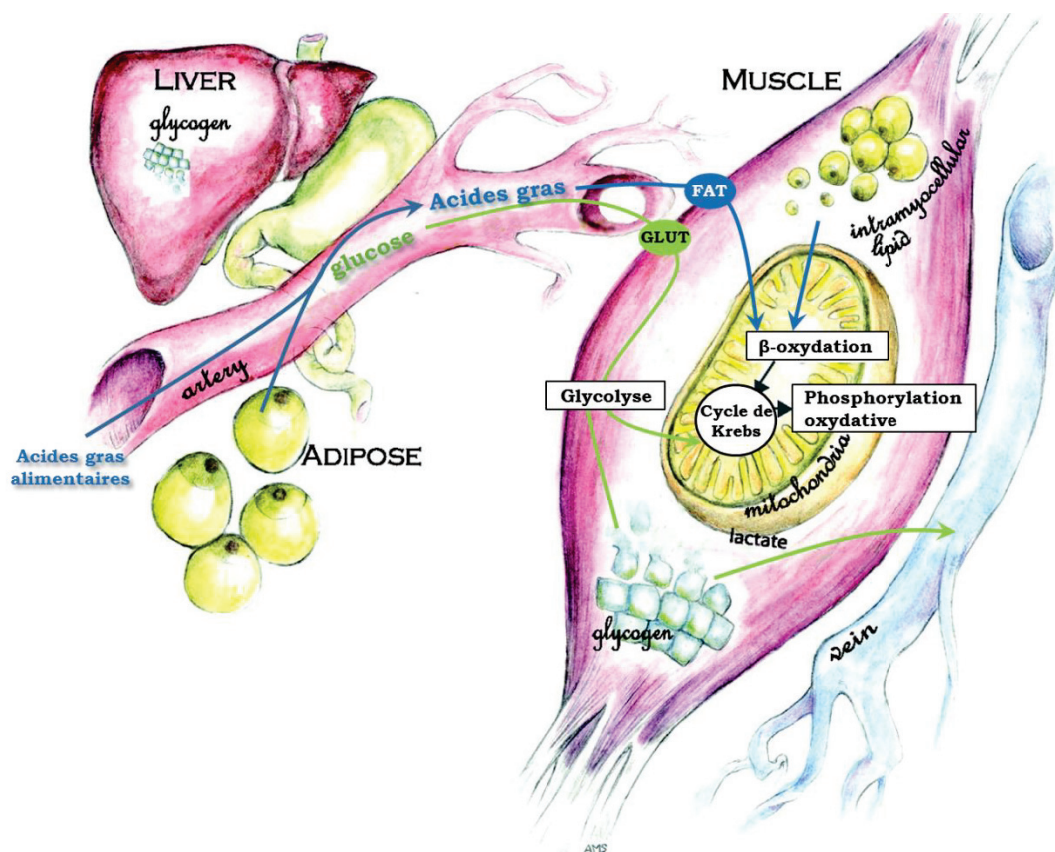
Lors de l'effort physique, la contraction du muscle induit de nombreux changements au niveau cellulaire liés soit à la fonction contractile soit à l'utilisation des substrats (Figure 3). Les changements induits dans l'homéostasie du muscle squelettique activent ainsi un réseau d'effecteurs modulant différentes voies métaboliques au sein du muscle.



**Figure 3. Voies de signalisation impliquées lors de la contraction musculaire au cours d'un effort physique.** La contraction musculaire perturbe l'homéostasie musculaire notamment par la consommation d'énergie, la diminution de la pression partielle, et une modification des flux ioniques, notamment calcique. Ces signaux activent des voies de signalisation comme la voie de l'AMPK, de JNK ou des sirtuines, à l'origine d'une réponse à plus long terme à l'exercice activant un réseaux de molécules de signalisation tels que les protéines kinases, phosphatases et désacétylases, impliquées dans des processus physiologiques.

Parmi les nombreux effets de l'exercice dans le tissu musculaire, on peut souligner l'implication de l'AMPK (AMP-activated protein kinase), une protéine kinase ayant un rôle très important dans le métabolisme musculaire.

Sur le plan énergétique, lors de la contraction musculaire, l'ATP stockée dans les muscles sollicités est rapidement consommée et doit être renouvelée. La consommation massive d'ATP dans les cellules musculaires augmente le rapport AMP/ATP ce qui déclenche l'activation de l'AMPK (Goodyear 2000). Une fois activée, l'AMPK participe à l'homéostasie énergétique musculaire en stimulant les voies cataboliques génératrices d'ATP, comme l'oxydation des acides gras ou la glycolyse (Figure 4), et en inhibant les voies anaboliques ou consommatrices d'ATP, comme la synthèse des protéines, de cholestérol et des acides gras.



**Figure 4. Utilisation des substrats par le muscle lors de l'effort physique.** Lors de la contraction musculaire, le transport du glucose, la glycolyse et l'oxydation des lipides sont stimulées.

*D'après Riddell (2008)*

La phosphorylation de l'AMPK permet également la phosphorylation de l'eNOS stimulant alors l'expression des GLUT4 (Glucose transporter type 4), favorisant ainsi le transport du glucose (Friedrichsen et al. 2013) (Figure 4). La

phosphorylation de l'AMPK permet également l'activation de PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ) stimulant ainsi VEGF (Vascular endothelial growth factor) qui sont tous deux des régulateurs positifs de l'angiogenèse dans le muscle favorisant ainsi le transport et la captation de l'oxygène dans le muscle squelettique (Leick et al. 2009). L'activation de PGC-1 $\alpha$  via l'AMPK permet également d'améliorer le métabolisme des lipides, d'augmenter la biosynthèse des mitochondries et faciliter l'augmentation des fibres lentes oxydatives dans le muscle (Jäger et al. 2007).

Le réseau d'effecteurs mis en jeu dans le muscle lors de l'effort physique étant riche et complexe, les changements induits par l'inactivité physique, par exemple l'atrophie musculaire observée dans les protocoles de bed-rest, induisent une véritable reprogrammation de l'expression génique musculaire comme le montre l'étude de Chopard et al. (2009). Dans cette étude, l'analyse à large échelle de l'expression des gènes dans les muscles *soleus* et *vastus lateralis* de femmes en bonne santé avant et après participation à un bed-rest de 60 jours, montre une modification des gènes impliqués dans la synthèse et la dégradation des protéines, dans le remodelage du cytosquelette et de la matrice extracellulaire, la phosphorylation oxydative et le métabolisme des acides gras.

Dans une étude de bed-rest de 7 jours, chez des sujets de sexe masculin en bonne santé, Mikines et al. (1989) ont observé une diminution de l'action de l'insuline sur la captation et le stockage du glucose au niveau musculaire. Dans la continuité de ces résultats, Tabata et al. (1999) ont montré dans un autre protocole de bed-rest, de 19 jours chez des sujets de sexe masculin en bonne santé, une diminution de l'expression du transporteur du glucose GLUT4 dans le muscle *vastus lateralis*. Ces résultats indiquent que l'inactivité physique détériore rapidement les fonctions métaboliques, comme la sensibilité à l'insuline musculaire contribuant à une insulino-résistance systémique (Booth et al. 2002).

#### b. Les effets de l'activité physique au-delà du muscle

Les effets bénéfiques de l'activité physique, et délétères de l'inactivité physique et/ou de la sédentarité dépassent largement les effets directs sur le muscle par la contraction, mais impliquent d'autres organes, comme le foie, le cœur ou le pancréas.

Si une grande partie des effets de l'activité physique peut être expliquée par les effets de la contraction musculaire, notamment sur l'insulinosensibilité ou l'oxydation des lipides au niveau musculaire, d'autres tissus sont mobilisés par l'activité physique, tels que les tissus du système cardiovasculaire. De façon évidente le cœur est sollicité lors de l'exercice et plus particulièrement lors des exercices d'intensité élevée afin d'adapter le débit sanguin nécessaire à l'approvisionnement du muscle en oxygène et en substrats. La sollicitation d'un ou plusieurs groupes musculaires du fait d'une pratique régulière d'activité physique s'accompagne, grâce à la production de substances angiogéniques et au-delà des effets trophiques musculaires, d'une augmentation de la vascularisation locale, dont il a été montré qu'elle participe à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline à l'échelon de l'organisme (Leick et al. 2009; Pinto et al. 2012). Le tissu adipeux représentant un réservoir énergétique de lipides peut être également mobilisé lors de l'effort physique afin de fournir des acides gras par hydrolyse au muscle. Par ailleurs, il a été récemment suggéré que la détérioration (ou l'amélioration) de la capacité musculaire à oxyder les acides gras, notamment d'origine alimentaire, lors d'une inactivité physique (respectivement d'une activité physique régulière) pourrait contribuer – indépendamment de toute variation de la balance énergétique – à déterminer le devenir des acides gras en les orientant préférentiellement vers le tissu adipeux sous-cutané ou ectopique pour y être stockés (respectivement vers le muscle). En favorisant ainsi le stockage ectopique au niveau des différents tissus, l'inactivité physique (à l'inverse l'activité physique) pourrait ainsi avoir des effets indirects sur la fonction métabolique de nombreux organes, tels que le foie mais aussi le cœur ou le pancréas (Bergouignan et al. 2013).

Enfin, les effets bénéfiques à l'échelle corps entier de l'activité physique peuvent également s'expliquer par un dialogue inter-organe ou cross-talk, dont le rôle déterminant dans la coordination des tissus a été souligné par de nombreux travaux ces dernières années. Ainsi, le muscle strié squelettique joue un rôle important dans cette communication intercellulaire via la sécrétion de cytokines spécifiques, les myokines (Pedersen and Hojman 2012). Ces peptides spécifiques sont sécrétés par le muscle squelettique en réponse à l'exercice et agissent localement au niveau du muscle ou ciblent d'autres organes périphériques. Les myokines peuvent notamment moduler l'homéostasie des autres organes insulino-sensibles, comme le foie, le tissu adipeux et le pancréas, via les interleukines IL-6 et IL-15 (Pedersen and Hojman 2012; Pratesi et al. 2013). A titre d'exemple, en



réponse à l'exercice, IL-6 active notamment l'AMPK (AMP-activated protein kinase) dans le muscle et la PI3-kinase induisant une augmentation de la captation du glucose et l'oxydation lipidique dans le muscle. L'IL-6 étant également sécrétée dans la circulation, atteint le foie dans lequel elle active la production de glucose à partir des réserves de glycogène en réponse à l'exercice, et le tissu adipeux où elle déclenche la lipolyse (Pratesi et al. 2013).

Le dialogue inter-organe ne se limite pas au sens muscle vers les autres tissus périphériques, mais le tissu adipeux peut également participer au dialogue inter-organe. La stimulation de la lipolyse par l'IL-6 déclenche également la sécrétion d'acides gras par les adipocytes, dans la circulation (Tomas et al. 2004). Le tissu adipeux étant également un tissu endocrine sécrétant des cytokines spécifiques, tels que l'adiponectine, on peut supposer que l'activité physique pourrait impacter leur métabolisme modulant ainsi le dialogue du tissu adipeux vers le muscle.

Par ailleurs, les microARNs, des régulateurs de l'expression des gènes récemment identifiés, sont exprimés par les tissus et peuvent être sécrétés dans la circulation, pourraient ainsi prendre également part au dialogue inter-organe.

#### F. Questions en suspens

Si les effets délétères d'une inactivité physique et de la sédentarité, et les effets bénéfiques de l'activité physique en termes de pathologie sont bien étudiés et démontrés, les mécanismes sous-jacents associés à ces effets, principalement examinés dans des études de physiologie de l'exercice et dans le muscle, ne sont pas encore totalement élucidés.

Dans les études basées sur des interventions modulant le niveau d'activité physique, afin d'examiner les mécanismes biologiques impliqués dans les effets de l'activité/inactivité physique et sédentarité, induisent généralement une variation de la masse grasse des sujets. De ce fait, il est difficile de différencier les effets propres d'une variation du niveau d'activité physique indépendamment des effets induits par une variation de la masse grasse.

Dans ce travail de thèse, je me suis intéressée aux effets propres de l'activité et inactivité physique modérée et inactivité extrême, incluant la notion d'activité physique non liée à l'exercice, dans des conditions de balance énergétique stable, i.e. indépendamment des effets de l'activité/inactivité physique sur la masse grasse. J'ai pu aborder les effets de l'activité/inactivité physique dans le muscle mais

également sur d'autres organes, tels que le foie, et sur deux acteurs potentiels du cross-talk, l'adiponectine issue du tissu adipeux et les microARNs.



## II. Adiponectine et ses liens avec l'activité physique

### A. Généralités

Au-delà de sa fonction de stockage, le tissu adipeux est aujourd'hui considéré comme un véritable organe endocrine, sécrétant notamment des cytokines spécifiques du tissu adipeux, les adipokines. Parmi celles-ci, l'adiponectine est très particulière car elle est probablement la seule adipokine dont les concentrations sont liées de façon inverse avec la masse grasse et dont les effets sont plutôt bénéfiques. De nombreuses études indiquent en effet que les taux plasmatiques d'adiponectine sont diminués dans l'obésité (Balsan et al. 2015), mais aussi, et ce indépendamment de l'obésité, avec les maladies cardiovasculaires (Kumada et al. 2003), l'hypertension (Ouchi et al. 2003) ou encore le syndrome métabolique (Trujillo and Scherer 2005). En outre, l'adiponectine est une des hormones dont les concentrations plasmatiques sont les plus élevées, entre 0,5 et 30µg/mL, représentant ainsi 0,01% des protéines plasmatiques totales (Hotta et al. 2000).

L'adiponectine a été découverte pour la première fois en 1995 et identifiée dans le tissu adipeux par plusieurs équipes, qui lui ont donné diverses appellations : Arcp30 pour adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Scherer et al. 1995) ; AdipoQ pour adipose gene Q (Hu et al. 1996) ; apM1 pour adipose most abundant gene transcript 1 (Maeda et al. 1996) ; et GBP28 pour gelatin-binding protein of 28 kDa (Nakano et al. 1996) ; avant d'être appelée *adiponectine* depuis 1999. Depuis, de nombreux travaux ont permis d'établir le rôle déterminant de l'adiponectine dans l'homéostasie énergétique, le métabolisme des lipides et des glucides, notamment musculaire et hépatique, ainsi que ses propriétés anti-inflammatoires et anti-athérogéniques (Van Berendoncks and Conraads 2011). Les effets de l'adiponectine étant assez proches de ceux de l'activité physique, il a été supposé que les effets de l'activité physique sur la santé pourraient, pour une part, impliquer l'adiponectine. De nombreuses études se sont ainsi tout naturellement intéressées aux liens entre activité physique et adiponectine, qui restent toutefois imparfaitement élucidés.

Dans ce chapitre, après avoir rappelé la structure, la synthèse et la régulation de l'adiponectine et de ses récepteurs, nous décrirons ses effets à l'échelle de l'organisme et des tissus, puis au niveau cellulaire ; enfin un point sur

la littérature concernant les effets de l'activité physique sur l'adiponectine et son métabolisme sera présenté.

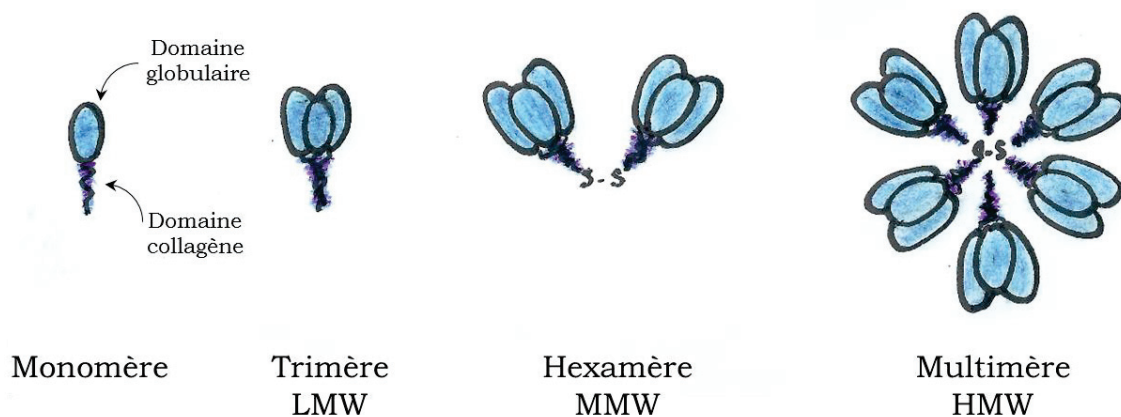
## B. Structure, synthèse et régulation de l'adiponectine

### 1. *Structure de l'adiponectine*

L'adiponectine est une protéine de 247 acides aminés pour un poids moléculaire de 30kDa chez la souris et 28kDa chez l'homme (Scherer et al. 1995; Nakano et al. 1996). La protéine native est synthétisée sous la forme d'un polypeptide monomérique composé d'une séquence signal N-terminale, d'une région variable, d'un domaine C-terminal globulaire et d'un domaine N-terminal de type collagène. Son domaine globulaire présente des homologies de séquence avec la fraction C1q du collagène, et de structure tertiaire avec celle du TNF- $\alpha$  (Shapiro and Scherer 1998).

L'adiponectine est présente dans le plasma sous trois formes multimériques dont l'assemblage est préalablement réalisé dans le réticulum endoplasmique par des modifications post-traductionnelles, telles que des hydroxylations et glycosylations, du monomère d'adiponectine. Le domaine globulaire permet la formation de trimères de faible poids moléculaire (LMW) par liaison hydrophobe, et les interactions au niveau du domaine collagène par des ponts disulfures permettent la formation des hexamères de moyen poids moléculaire (association de deux trimères, MMW), et de multimères de haut poids moléculaire (4 à 6 trimères, HMW) (Figure 5). L'adiponectine est également présente dans le plasma sous sa forme globulaire seule, issue d'une protéolyse, mais en très faible quantité (Fruebis et al. 2001). Du fait de cette polymérisation, les formes d'adiponectine rencontrées dans le plasma couvrent une gamme de 17kDa (formes globulaires) à 700kDa (formes multimériques).

Les différentes formes d'adiponectine présentent des propriétés biologiques distinctes et probablement des cibles tissulaires différentes. L'injection d'adiponectine marquée par fluorescence chez la souris a montré que ces différentes formes sont stables et ne peuvent être interconverties dans le sérum (Schraw et al. 2008). La stabilité des isoformes d'adiponectine dans la circulation montre que la production et la sécrétion de l'adiponectine par le tissu adipeux ont un rôle important dans la distribution circulante de ces isoformes.



**Figure 5. Polymérisation de l'adiponectine** : l'adiponectine de haut poids moléculaire est formée par l'assemblage dans le réticulum endoplasmique de deux ou trois hexamères, composés eux-mêmes de deux trimères, formés à partir de trois monomères.

*D'après Bastard et al. (2012)*

## 2. Synthèse de l'adiponectine

Initialement, seul le tissu adipeux était considéré comme sécrétant l'adiponectine (Hu et al. 1996). Contrairement aux autres adipokines, l'adiponectine présente une relation inverse avec l'obésité (Arita et al. 1999). Plusieurs études ont montré qu'une perte de poids, notamment une réduction de la masse grasse s'accompagnait d'une augmentation des taux circulants d'adiponectine (Yang et al. 2001; Hara et al. 2005). L'augmentation de l'adiponectine circulante induite par les pertes de poids n'est pas homogène mais se fait en faveur de la forme HMW et au détriment des formes LMW et MMW (Kobayashi et al. 2004). Cette donnée est importante, si on considère que la forme de haut poids moléculaire est actuellement considérée comme la forme active d'adiponectine, ou au moins une forme plus active que les formes LMW et MMW d'adiponectine (Pajvani et al. 2004; Wang et al. 2008).

Bien que le tissu adipeux soit la source principale de l'adiponectine circulante, il est aujourd'hui établi que d'autres types cellulaires expriment également l'adiponectine, tels que les ostéoblastes (Berner et al. 2004), le tissu fœtal (Caminos et al. 2005), les cardiomyocytes (Pineiro et al. 2005) ou encore le muscle squelettique (Fiaschi et al. 2014).

Les taux circulants d'adiponectine sont significativement plus élevés chez les femmes que chez les hommes. Au cours de la puberté, une diminution de la concentration circulante d'adiponectine est notamment observée chez les enfants de sexe masculin mais pas féminin (Andersen et al. 2007). Par ailleurs, les taux circulants d'adiponectine varient également selon l'ethnicité (Sulistyoningrum et al.

2013) et sont positivement associées avec l'âge (Cnop et al. 2003). Arai et al. (2006) ont notamment montré que des centenaires présentaient des taux circulants d'adiponectine supérieurs à des personnes plus jeunes, de même IMC. La masse grasse des sujets n'a cependant pas été mesurée dans cette étude.

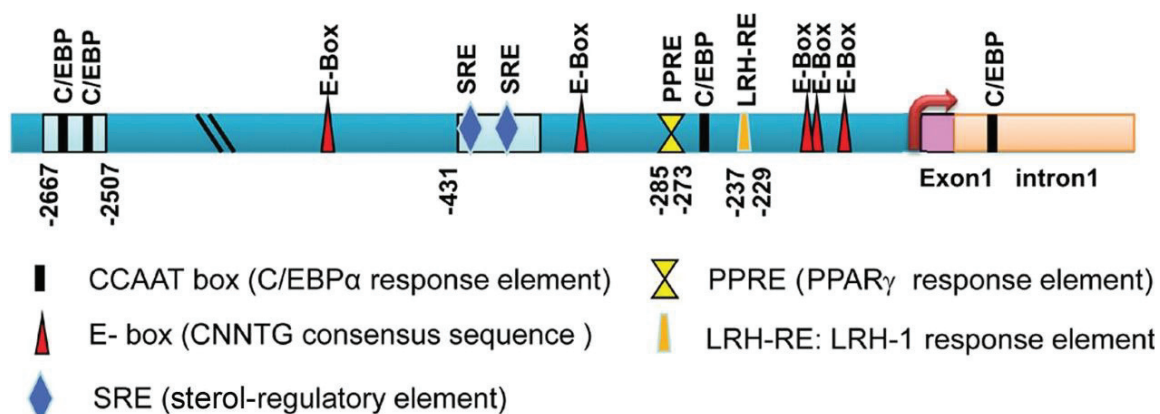
Le profil de variation circadien de l'adiponectine montre que les concentrations fluctuent d'environ 20% sur 24h, avec une légère diminution des taux pendant la nuit jusqu'à un minimum en début de matinée (Gavrila et al. 2003). Cette variation journalière semble plus importante chez les femmes que chez les hommes et ne différerait pas entre sujets minces et obèses (Swarbrick and Havel 2008).

### 3. Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de l'adiponectine

#### a. Le gène de l'adiponectine

Le gène de l'adiponectine, d'une longueur de 17 kb, se situe sur le chromosome 3 au niveau du locus 3q27, et contient 3 exons et 2 introns (Takahashi et al. 2000) (Figure 6). Le promoteur du gène de l'adiponectine comporte des sites de liaison pour plusieurs facteurs de transcription, indiquant que la régulation de ce gène se fait par plusieurs signaux (Liu and Liu 2010).

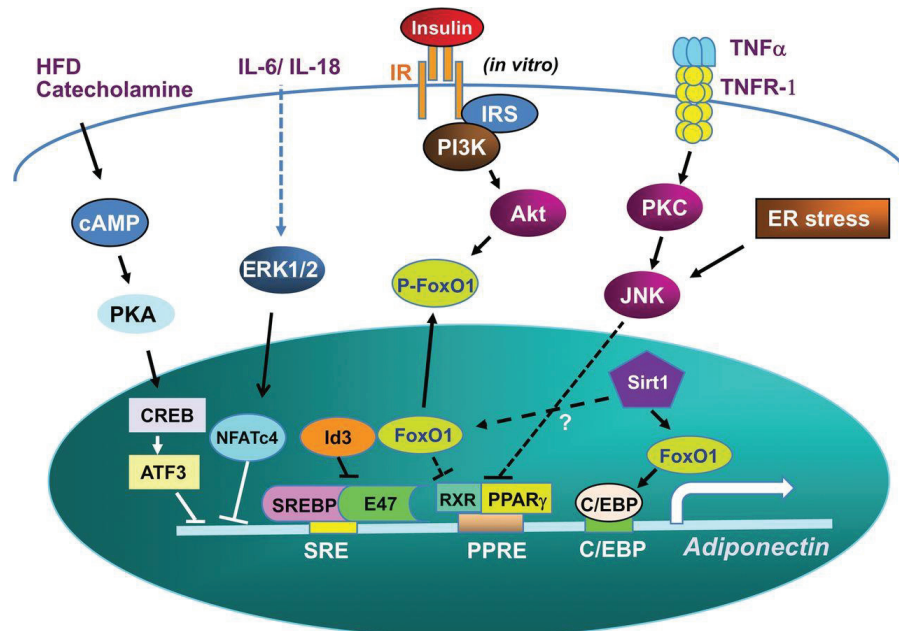
La transcription du gène de l'adiponectine est principalement stimulée par des facteurs de transcription impliqués dans l'adipogénèse, tels que PPAR $\gamma$ , FoxO1 (forkheadbox factor 1), C/EBP $\alpha$ , et SREBP (SRE binding protein). Il est suggéré que l'insuline régule de façon positive le gène de l'adiponectine en activant PPAR $\gamma$  via la suppression de l'activité de FoxO1 (Liu and Liu 2010) (Figure 6).



**Figure 6. Structure du promoteur du gène humain de l'adiponectine.** La zone promotrice du gène de l'adiponectine contient des motifs permettant la liaison des facteurs de transcription : un élément de réponse PPAR $\gamma$  (PPRE), deux éléments régulateurs stérol (SRE) permettant la liaison de SREBP et E47, et plusieurs éléments activateurs C/EBP $\alpha$  et un certain nombre de séquences consensus E-boxes.

*D'après Liu and Liu (2010)*

Dans l'obésité, l'augmentation de la masse grasse favorise l'hypoxie qui, via l'activation de la voie HIF-1 (hypoxia inducible factor 1), a un effet inhibiteur sur l'expression de l'adiponectine (Chen et al. 2006). L'obésité est également accompagnée d'un état inflammatoire chronique, caractérisé notamment par une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor) et les interleukines IL-6 et IL-18, qui inhibent également l'expression de l'adiponectine (Simons et al. 2007; Chandrasekar et al. 2008; Zappalà and Rechler 2009) (Figure 7). De plus, des facteurs de transcription impliqués dans l'inflammation comme CREB (cAMP response binding protein) et NFAT (nuclear factor of activated T-cells) sont également impliqués dans les effets répressifs de l'obésité sur le gène de l'adiponectine (Kim et al. 2006a; Qi et al. 2009) (Figure 7).



**Figure 7. Voies de signalisation impliquée dans le contrôle de la régulation de la transcription de l'adiponectine.** Les cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF $\alpha$ , IL-6 et IL-18, activent via la voie ERK1/2 les facteurs de transcription impliqués dans l'inflammation comme CREB et NFAT et inhibent l'expression du gène de l'adiponectine. A l'inverse, via son action sur FoxO1 l'insuline régule positivement l'expression du gène de l'adiponectine.

*D'après Liu et al. (2010)*

L'inflammation induite dans l'obésité augmente également le stress oxydant dans le tissu adipeux, qui a, lui aussi, un effet inhibiteur sur l'expression de l'adiponectine via l'inhibition des facteurs de transcription PPAR $\gamma$  (Chen et al. 2006).



Laughlin et al. (2007) ont suggéré que le dimorphisme sexuel observé dans les taux circulants d'adiponectine serait expliqué par les hormones sexuelles. En effet, des niveaux élevés de testostérone et faibles d'estradiol étaient associés à des taux circulants d'adiponectine plus élevés chez les deux sexes. Cependant, une étude *in vitro* dans des adipocytes humains ne retrouve pas d'effet de ces hormones sur l'expression cellulaire et la sécrétion des différentes formes d'adiponectine (Horenburg et al. 2008). Ces derniers auteurs ont cependant observé que le traitement d'adipocytes par du sérum de sujets masculins inhibait la synthèse d'adiponectine en comparaison à un traitement avec des sérums de sujets féminins, suggérant la présence d'un facteur, autre que ces hormones sexuelles, dans le sérum expliquant le dimorphisme sexuel.

Enfin, l'adiponectine elle-même pourrait avoir un rétrocontrôle négatif sur son expression. En effet, Bauche et al. (2006) ont montré chez des souris transgéniques pour le gène de l'adiponectine, *i.e.* expression exogène d'adiponectine spécifiquement dans le tissu adipeux (construction transgénique injectée dans la cellule œuf lors de la fécondation *in vitro*), une diminution par rétrocontrôle de la concentration d'adiponectine endogène dans le tissu adipeux et dans la circulation, ainsi qu'une baisse du récepteur à l'adiponectine AdipoR2. En parallèle, ces souris présentaient un profil métabolique altéré avec une intolérance au glucose, une résistance à l'insuline et une augmentation de leur adiposité.

#### b. Régulation post-transcriptionnelle de l'adiponectine

Un déficit dans la multimérisation de l'adiponectine affecte la sécrétion et la fonctionnalité de l'adiponectine, et est associée avec le développement de la résistance à l'insuline, le diabète de type 2 et l'obésité (Liu and Liu 2010; Yadav et al. 2013). Ceci suggère que l'agrégation de l'adiponectine en différentes structures multimériques est nécessaire à son action.

La multimérisation de l'adiponectine requiert la modification des quatre résidus de proline et des cinq résidus de lysine du domaine collagène de l'adiponectine par des réactions d'hydroxylation et de glycosylation. La formation de ponts disulfure entre les acides aminés cystéine de l'adiponectine est également essentielle pour sa multimérisation (Wang et al. 2008). La dérégulation des réactions d'hydroxylation et de glycosylation de la lysine du domaine collagène de l'adiponectine affecte ainsi sa multimérisation ; cette dernière est encore plus

sévèrement altérée lorsque l'hydroxylation de la proline est dérégulée (Liu and Liu 2010).

La multimérisation de l'adiponectine dans le réticulum endoplasmique est également stimulée par la protéine DsbA-L (disulfide-bond A oxidoreductase-like protein) dont l'expression, tout comme l'adiponectine, est inversement associée avec l'obésité (Liu et al. 2015a). La suppression de l'expression de DsbA-L par des ARNs interférents ARNi inhibe la multimérisation et diminue la quantité d'adiponectine dans les adipocytes 3T3-L1 (Liu et al. 2008b). Ces mécanismes affectant la multimérisation pourraient ainsi participer aux défauts métaboliques en lien avec l'adiponectine dans l'obésité.

#### c. Mécanismes de sécrétion et régulation

La sécrétion de la forme HMW est étroitement contrôlée par deux protéines chaperonnes du réticulum endoplasmique, ERp44 (endoplasmic reticulum protein of 44 kDa) et Ero1La (endoplasmic reticulum membrane-associated oxidoreductase-La). ERp44 retient l'adiponectine dans le réticulum endoplasmique par une interaction covalente avec le groupement thiol de la cystéine, inhibant ainsi la sécrétion de l'adiponectine. A l'inverse, Ero1La libère l'adiponectine HMW piégée par ERp44 (Wang et al. 2008).

La suppression d'Ero1-La par des ARN interférents (ARNi) réduit la production d'adiponectine pendant la différenciation de préadipocytes 3T3-L1, et augmente la sécrétion de la forme trimérique de l'adiponectine. A l'inverse, la surexpression d'Ero1-La combiné avec une altération d'ERp44 stimule la sécrétion de l'adiponectine (Wang et al. 2007).

Ero1-La régule également la multimérisation de l'adiponectine en fonctionnant comme une oxydoréductase qui induit la formation des ponts disulfure de l'adiponectine (Liu and Liu 2010).

#### d. Cinétique et métabolisme de l'adiponectine

Comme n'importe quelle hormone circulante, la sécrétion d'adiponectine est régulée de façon à maintenir un état d'équilibre (homéostasie) qui dépend également de la clairance de l'adiponectine.

Le taux de renouvellement de l'adiponectine est 5 à 10 fois plus faible que la plupart des hormones polypeptidiques, ce qui est expliqué par une demi-vie longue de l'adiponectine dans le plasma (de 1h15 chez la souris et 2h30 chez l'homme),

alors que les hormones, incluant la leptine, ont des demi-vies comprises entre 15 et 30 minutes (Hoffstedt et al. 2004; Halberg et al. 2009).

La clairance de l'adiponectine semble dépendre de la biodisponibilité et de l'activité de l'adiponectine. Halberg et al. (2009) ont montré qu'une forme plus active de l'adiponectine, obtenue par mutation de la cystéine 39 modifiant le pont disulfure au sein du trimère, avait une demi-vie de seulement quelques minutes. D'autre part, ils ont montré que, dans des modèles de souris en surpoids ou soumises à un régime gras, et où les taux plasmatiques d'adiponectine sont réduits, la clairance est prolongée (Halberg et al. 2009). Ces résultats suggèrent qu'une clairance rapide va de pair avec une forte biodisponibilité et bioactivité alors qu'à l'inverse, une clairance retardée est un indicateur d'une dysfonction métabolique périphérique.

La clairance de l'adiponectine serait majoritairement assurée par le foie (Halberg et al. 2009) mais une composante rénale doit également être considérée (Kopf et al. 2014).

### C. Effets biologiques de l'adiponectine

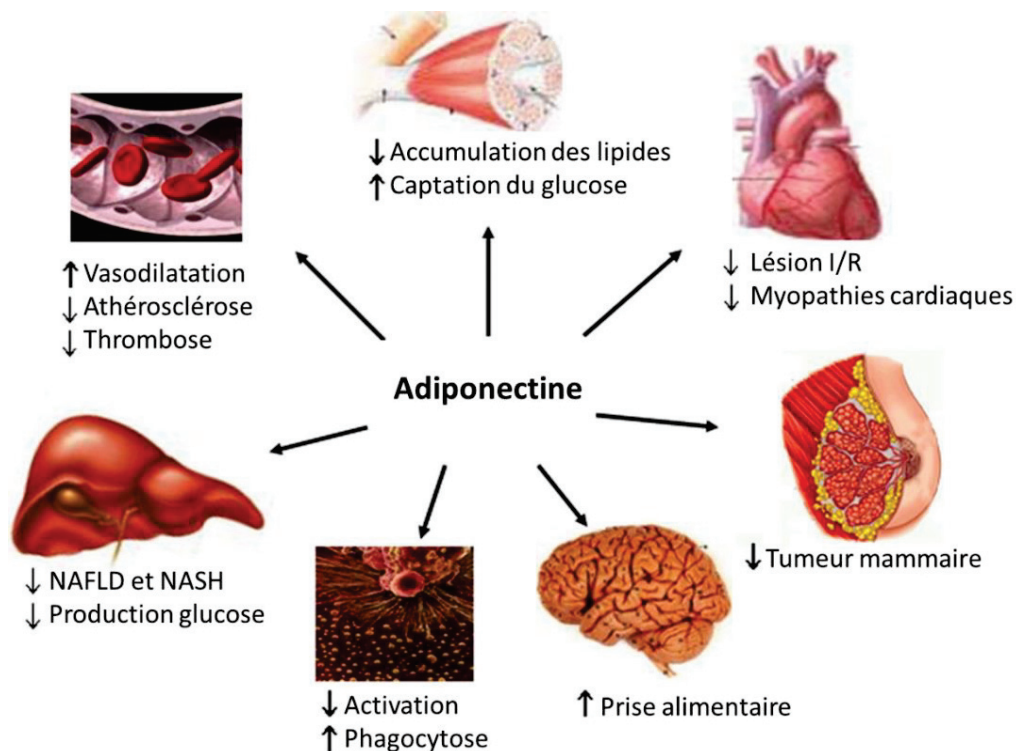
#### 1. *Effets systémiques de l'adiponectine*

L'adiponectine exerce ses effets bénéfiques sur le métabolisme en améliorant la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose, et en favorisant l'utilisation des lipides. En plus de son rôle important dans le métabolisme, l'effet bénéfique de l'adiponectine a été démontré dans de nombreuses pathologies associées à l'obésité, telles que l'hypertension, l'athérosclérose, la stéatose et les maladies hépatiques non alcooliques (NASH, NAFLD), l'inflammation des voies aériennes, voire même certains cancers (Wang et al. 2008), suggérant un mode d'action plus large et direct sur de nombreux tissus cibles (Figure 8).

#### a. Effets sur le métabolisme des glucides et l'insuline

De nombreuses études se sont intéressées au rôle de l'adiponectine dans le métabolisme lipidique et glucidique. Fruebis et al. (2001) ont montré que la forme globulaire de l'adiponectine augmente l'oxydation des acides gras dans les muscles de souris, entraînant une perte de poids chez l'animal. La forme globulaire et de haut poids moléculaire augmentent l'utilisation du glucose et l'oxydation des acides gras dans le muscle via l'activation de l'AMPK dans le muscle squelettique (Yamauchi et al. 2002).

L'activation de l'AMPK par la forme globulaire permet également d'améliorer la captation du glucose par les adipocytes (Wu et al. 2003).



**Figure 8. Diversité des tissus cibles de l'adiponectine.** Les effets biologiques bénéfiques de l'adiponectine sont nombreux notamment sur les maladies cardiovasculaires, les lésions hépatocellulaires, le métabolisme ou encore l'inflammation. I/R, ischémie-reperfusion; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NASH, non-alcoholic steatohepatitis.

*D'après (Wang et al. 2008)*

#### b. Effets sur l'insuline

Plusieurs études ont examiné le rôle de l'adiponectine dans la sensibilité à l'insuline.

Berg et al. (2001) ont montré que l'adiponectine améliore les effets de l'insuline. Ainsi l'adiponectine peut corriger partiellement la résistance à l'insuline dû à l'obésité (Yamauchi et al. 2001), et offrir une prévention vis-à-vis du diabète de type 2 (Yamauchi et al. 2003a). Kubota et al. (2002) ont montré que des souris KO pour l'adiponectine présentaient une augmentation de la résistance à l'insuline.

En outre, il a été montré que l'adiponectine globulaire augmente la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques en situation d'hyperglycémie via l'activation de l'AMPK (Gu et al. 2006).

### c. Effets anti-inflammatoires

De nombreuses études ont montré les propriétés anti-inflammatoires de l'adiponectine, qu'elle exerce en modulant l'action et la production de cytokines. Elle réduit ainsi l'inflammation via l'inhibition des récepteurs NF- $\kappa$ B et de l'expression des TNF- $\alpha$ , et l'activation de l'expression de l'interleukin-10 et de l'interleukin-1 (Moschen et al. 2012; Gatselis et al. 2014).

### d. Effets sur le métabolisme énergétique

De façon un peu surprenante, à l'inverse des effets périphériques, l'activation de l'AMPK dans le système nerveux central par l'adiponectine via son récepteur AdipoR1, module le métabolisme énergétique systémique en stimulant l'absorption de nourriture et diminuant la dépense énergétique (Kubota et al. 2007; Quaresma et al. 2015).

## 2. Effets tissulaires

Les deux tissus cibles principaux de l'adiponectine sont le foie et le muscle squelettique.

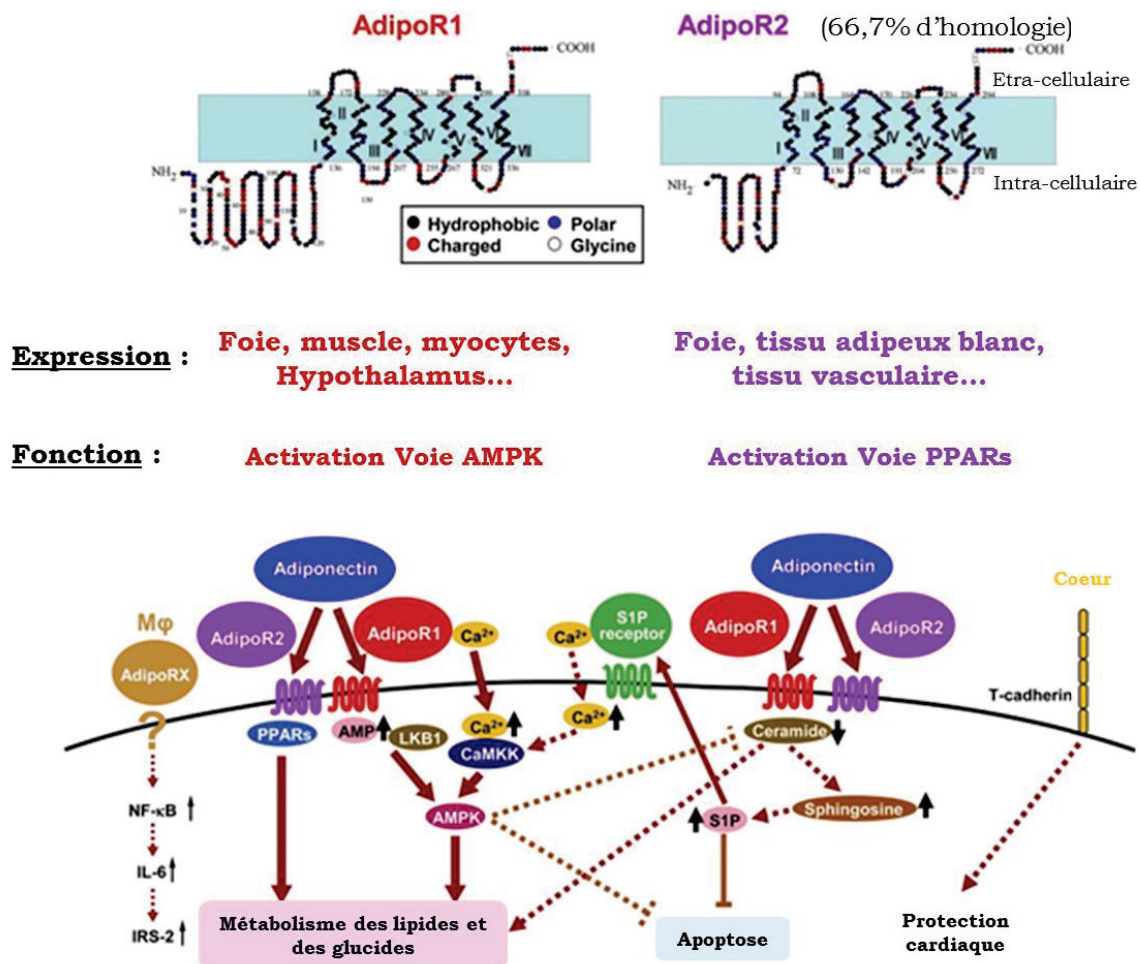
Le muscle squelettique est une cible privilégiée de l'adiponectine pour la régulation du métabolisme glucidique et lipidique (Fruebis et al. 2001; Yamauchi et al. 2002). L'adiponectine est également capable de stimuler la synthèse des protéines et d'inhiber leur dégradation (protéolyse) par la stimulation des voies de signalisation de l'insuline (Brochu-Gaudreau et al. 2010).

Les deux récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 sont détectés dans le muscle squelettique

L'inflammation hépatique, ainsi que la résistance à l'insuline sont d'importants facteurs physiopathologiques dans le développement des maladies hépatiques non alcoolique (NAFLD) (Marchesini and Forlani 2002; Moschen et al. 2012). Comme on a pu le voir ci-dessus, l'adiponectine favorise le métabolisme glucido-lipidique et améliore la sensibilité à l'insuline, ce qui lui confère des effets bénéfiques anti-stéatose. Dans une revue systématique de la littérature sur les liens entre NAFLD et taux plasmatiques d'adiponectine, Polyzos et al. (2011) ont montré que des taux bas d'adiponectine étaient une des caractéristiques des patients présentant une stéatose hépatique non alcoolique.

## 3. Structure des récepteurs de l'adiponectine

Pour exercer ses effets biologiques, l'adiponectine doit se lier à ses récepteurs spécifiques. Les récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 ont dans un premier temps été identifiés par Yamauchi et al. (2003b), puis ultérieurement, la Cadhérine-T, ou CDH13, a également été identifiée comme récepteur à l'adiponectine (Hug et al. 2004) (Figure 9).



**Figure 9. Structure, répartition tissulaire et voies de signalisation des récepteurs AdipoR1, AdipoR2 et T-Cadherin de l'adiponectine.** Les récepteurs transmembranaires AdipoR1 et AdipoR2 présentent 67% d'homologie. AdipoR1 est majoritairement exprimé dans le foie et le muscle squelettique, et AdipoR2 dans le foie et le tissu adipeux. L'activation de ces deux récepteurs par l'adiponectine augmente l'activité de l'AMPK et des PPARs impliquées dans la régulation du métabolisme des lipides et des glucides, et diminue les taux de céramides permettant une protection contre l'apoptose. Le récepteur associé à la membrane Cadhérine-T joue un rôle important dans la fonction cardioprotectrice de l'adiponectine.

*D'après Yamauchi et al. 2014*

#### a. Récepteurs AdipoR1 et AdipoR2

Les gènes des récepteurs d'AdipoR1 et AdipoR2 sont respectivement localisés sur les chromosomes 1, locus 1p36.13-q41, et 12, locus 12p13.31. Ils sont

constitués de 7 domaines transmembranaires, et possèdent une structure et une fonction différentes de celles des récepteurs couplés aux protéines G. Leur domaine C-terminal est extracellulaire alors que leur domaine N-terminal est intracellulaire, la topologie étant alors inversée à celles des protéines G (Yamauchi et al. 2003b).

Le récepteur AdipoR1 a une affinité plus élevée pour la forme globulaire, alors que le récepteur AdipoR2 se lie préférentiellement à la forme de haut poids moléculaire.

Il a été initialement montré que le récepteur AdipoR1 était majoritairement exprimé dans les muscles squelettiques et AdipoR2 dans le foie (Yamauchi et al. 2003b). Par la suite, l'expression de ces récepteurs a été objectivée dans d'autres tissus, comme le myocarde, les macrophages, le tissu cérébral, les cellules endothéliales, les lymphocytes et le tissu adipeux (Yamauchi et al. 2014), ou encore dans les cellules  $\beta$  pancréatiques où le niveau d'expression d'AdipoR2 est même équivalent à celui de son expression dans le foie, et le niveau d'expression d'AdipoR1 supérieur à celui de son expression musculaire (Kharroubi et al. 2003).

Des études sur les souris ont confirmé que ces deux récepteurs sont les principaux récepteurs de l'adiponectine *in vivo* et qu'ils servent d'intermédiaires aux effets de l'adiponectine (Yamauchi et al. 2007). Ainsi, des souris KO pour ces deux récepteurs développent une intolérance au glucose et une hyper-insulinémie, montrant leur implication majeure dans l'homéostasie glucidique et la sensibilité à l'insuline. Ces effets semblent récepteurs-spécifiques, avec notamment l'implication d'AdipoR1 dans l'activation de l'AMPK alors que AdipoR2 est impliqué dans l'activation de PPAR $\alpha$  (Yamauchi et al. 2014).

D'une façon plus générale, une étude d'invalidation de ces récepteurs a mis en évidence que l'implication des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 dans le métabolisme est très différente (Bjursell et al. 2007). Ils ont notamment montré que des souris KO pour le récepteur AdipoR1 augmentent leur masse adipeuse, diminuent leur tolérance au glucose et la dépense énergétique. A l'inverse, des souris KO pour le récepteur AdipoR2 présentent une meilleure sensibilité à l'insuline et au glucose, maintiennent un poids corporel normal même sous régime gras, dépensent plus d'énergie et améliorent leur dyslipidémie.

#### b. Récepteur Cadherine-T

Le gène du récepteur Cadherine-T est localisé sur le chromosome 16, et plus précisément sur le locus 16q23.3. La Cadherine-T est une protéine associée à la

membrane plasmique par une ancre GPI glycosyl-phosphatidylinositol, constitué de 5 domaines extracellulaires. En revanche, elle ne possède pas de domaine transmembranaire ou cytoplasmique (Ranscht and Dours-Zimmermann 1991).

La Cadhérine-T sert de récepteur pour l'adiponectine MMW et de HMW, mais pas pour les formes globulaires et LMW (Hug et al. 2004). Initialement identifiée dans le système nerveux, son expression est plus généralisée, avec une forte expression dans le système cardiovasculaire et dans une moindre mesure dans le muscle (Hug et al. 2004).

Du à l'absence de domaine intracellulaire, l'action de la Cadhérine-T sur la transduction du signal de l'adiponectine ne serait pas directe mais cette dernière favoriserait la liaison de l'adiponectine sur la membrane. Des études ont notamment montré que des souris déficientes en Cadhérine-T présentaient un défaut de liaison entre l'adiponectine et le tissu cardiaque, empêchant le rôle cardio-protecteur de l'adiponectine, mettant en évidence son rôle indispensable dans le tissu cardiaque (Denzel et al. 2010).

La transduction du signal n'étant pas directe, l'action de l'adiponectine par le biais de la Cadhérine-T nécessiterait également la présence d'une autre protéine transmembranaire qui pourrait être AdipoR1 ou AdipoR2 (Van Berendoncks and Conraads 2011).

#### *4. Régulation de l'expression des récepteurs de l'adiponectine*

Divers facteurs régulent l'expression des récepteurs à l'adiponectine, qui sont ainsi exprimés différemment selon les tissus.

Dans le tissu adipeux de souris transgéniques pour le gène de l'adiponectine, présentant une surexpression ciblée de l'adiponectine dans le tissu adipeux, le niveau d'expression du récepteur AdipoR2 est augmenté mais pas celui d'AdipoR1 (Bauche et al. 2006). Par ailleurs, dans le tissu adipeux, les niveaux d'expression des récepteurs à l'adiponectine sont associés avec le niveau d'expression tissulaire de l'adiponectine (Kim et al. 2006b). Les niveaux d'expression d'AdipoR1 et AdipoR2 sont inversement corrélés avec la masse grasse et l'obésité (Bluher et al. 2006; Rasmussen et al. 2006). Contrairement à l'expression de l'adiponectine elle-même, il n'y a pas de dimorphisme sexuel dans l'expression des récepteurs à l'adiponectine dans le tissu adipeux (Rasmussen et al. 2006).

McAinch et al. (2006) ont montré que l'adiponectine régulaient de façon positive le récepteur AdipoR1 dans des cellules primaires différenciées de muscles



squelettiques issus de sujets normo-pondérés, mais pas ceux issus de sujets diabétiques, obèses ou ayant perdu du poids. Le niveau d'expression du récepteur d'AdipoR2 n'était pas modifié dans cette étude. Dans une étude menée chez des cochons à jeun (24h), le niveau d'expression de la Cadhérine-T était diminué, ce qui suggère que son expression peut être régulée par le statut métabolique (Liu et al. 2008a). Les niveaux d'expression des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 sont également associées avec l'âge et la capacité aérobie dans le muscle squelettique (Storgaard et al. 2007). A l'inverse du tissu adipeux, l'expression des récepteurs à l'adiponectine dans le muscle dépend du sexe, les hommes exprimant plus les récepteurs à l'adiponectine (Storgaard et al. 2007), ce dimorphisme semblant ainsi être tissu spécifique. Il est intéressant de noter que les taux circulants d'adiponectine sont inférieurs chez les hommes, en comparaison des femmes, ce dimorphisme pouvant être expliqué par le niveau d'expression des récepteurs dans le muscle.

Enfin, une étude a montré que l'expression des trois récepteurs était fortement inter-corrélée, et positivement associée avec l'expression de PPAR $\delta$  dans des myocytes humains (Ordelheide et al. 2011).

### 5. *Sensibilité à l'adiponectine*

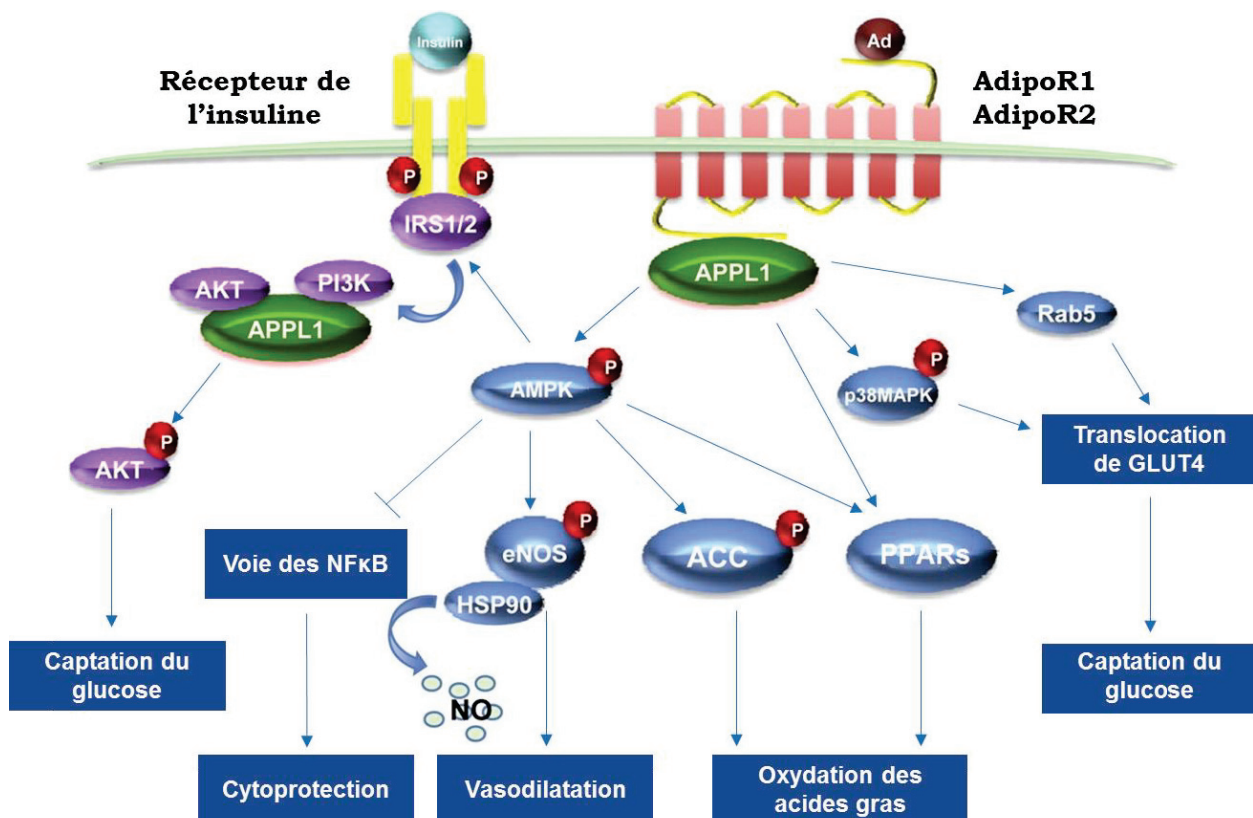
La notion de résistance à l'adiponectine a été introduite suite à une étude sur des patients atteints d'insuffisance cardiaque chronique associée à un mauvais pronostic (Kintscher 2007). Chez ces patients, les concentrations circulantes d'adiponectine étaient plus élevées laissant supposer que l'adiponectine était fonctionnellement inactive. Dans une autre étude sur des patients avec le même diagnostic, l'augmentation d'adiponectine était associée avec une inhibition de la voie AMPK/PPARs via l'inhibition du récepteur AdipoR1. Ces résultats suggèrent qu'une surexpression de l'adiponectine secondaire à la diminution de sensibilité à l'adiponectine permettrait et serait nécessaire pour compenser la résistance à l'adiponectine (Van Berendoncks and Conraads 2011).

D'autre part, une étude épidémiologique réalisée dans des populations asiatiques a montré une association forte entre les mutations génétiques du récepteur Cadhérine-T et les risques de maladies métaboliques (Gao et al. 2013). Les auteurs suggèrent que certaines mutations génétiques de CDH13 semblent modifier favorablement la sensibilité à l'adiponectine et permettent ainsi d'améliorer

les paramètres métaboliques, ceci pour des concentrations circulantes d'adiponectine plus faibles.

### 6. Voies de signalisation cellulaire de l'adiponectine

L'adiponectine exerce ses effets *via* ses récepteurs, AdipoR1, AdipoR2 et Cadhérine-T, principalement par l'activation de l'AMPK et PPAR $\alpha$ , qui sont les deux principales voies de signalisation de l'adiponectine. Le récepteur AdipoR1 active préférentiellement la voie AMPK dans le muscle, et le récepteur AdipoR2 la voie PPAR $\alpha$  dans le foie. D'autres voies de signalisation de l'adiponectine sont également impliquées, tels que les céramides ou la voie des NF- $\kappa$ B. Il est aujourd'hui démontré que, pour une part au moins, la transduction du signal adiponectine fait intervenir une protéine adaptatrice APPL1 (Figure 10).



**Figure 10. Principales voies de signalisation de l'adiponectine.** La liaison de l'adiponectine aux récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 permet le recrutement de l'effecteur APPL1 et la transduction du signal, activant la voie de l'AMPK impliquée dans le métabolisme des lipides et des glucides, la vasodilatation et la cytoprotection ; et les voies de signalisation impliquant la p38MAPK et RAB5 permettent de stimuler la translocation du GLUT4 favorisant le transport du glucose.

*D'après Deepa and Dong (2009) et Shehzad et al. (2012)*

#### a. Transduction du signal via APPL1

L'interaction entre l'adiponectine et l'extrémité extracellulaire carboxyl-terminal des récepteurs entraîne la liaison de la protéine APPL1 (Adaptor Protein, Phosphotyrosine Interaction, PH Domain And Leucine Zipper Containing 1) avec la région intracellulaire des récepteurs de l'adiponectine (Mao et al. 2006). L'APPL1 joue ainsi un rôle direct dans la cascade de signalisation de l'adiponectine.

La liaison d'APPL1 à une petite hydrolase du GTP (GTPase), Rab5, active la translocation du transporteur de glucose Glut4 qui active la captation du glucose dans le muscle. L'APPL1 active également deux autres enzymes, la MAPK (Kadowaki et al. 2006) et l'AMPK (Deepa and Dong 2009), qui activent de la même façon la captation du glucose. L'activation de l'AMPK entraîne également la phosphorylation de l'acétyl-coenzyme A carboxylase (ACC), favorisant ainsi l'oxydation des acides gras dans le muscle et le foie (Lafontan and Viguerie 2006). La phosphorylation de l'AMPK dans les cellules endothéliales, permet la phosphorylation de l'eNOS (endothelial nitric oxide synthase 3) permettant la vasodilatation des vaisseaux. Les effets anti-inflammatoires de l'adiponectine passe également par l'activation de l'AMPK qui inhibe la voie des facteurs NF- $\kappa$ B (Yamauchi et al. 2014).

Les effets de l'adiponectine sur la sensibilité à l'insuline sont également dépendants de l'APPL1 (Mao et al. 2006). L'APPL1 se lie notamment avec la protéine kinase B (Akt) et la sous-unité catalytique p110 $\alpha$  de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) permettant le rapprochement de ces deux protéines et ainsi la phosphorylation de l'Akt (Mitsuuchi et al. 1999). La phosphorylation de l'Akt permet ainsi d'activer la translocation de Glut4 et d'augmenter la captation du glucose (Mao et al. 2006). Enfin, les effets bénéfiques de l'adiponectine sur la sensibilité à l'insuline sont aussi le résultat d'une activation du métabolisme glucidique et lipidique via l'activation des PPAR $\alpha$  (Yamauchi et al. 2003b).

#### b. AMPK

L'AMPK est une protéine sérine/thréonine kinase exprimée dans de nombreux tissus, comme le muscle squelettique, le muscle cardiaque, l'hypothalamus, le foie, le tissu adipeux ou les cellules  $\beta$  pancréatiques. Cette protéine hétérotrimérique est constituée d'une sous-unité catalytique  $\alpha$  et de deux sous-unités régulatrices,  $\beta$  et  $\gamma$  (Kahn et al. 2005). L'état d'activation de l'AMPK dépend de la concentration intracellulaire en adénosine monophosphate AMP, qui est étroitement liée à la concentration en ATP. L'augmentation de l'AMP dans la

cellule conduit à une augmentation de la liaison de l'AMP sur l'AMPK permettant ainsi son activation (Yamauchi et al. 2007).

En termes de balance énergétique cellulaire, la voie de l'AMPK permet d'activer les voies de signalisation générant de l'ATP et d'inhiber celles qui sont consommatrices, notamment les voies anaboliques (Friedrichsen et al. 2013). Ainsi, l'AMPK régule l'homéostasie énergétique en inhibant la synthèse des substrats glucidiques et lipidiques tout en favorisant leur utilisation. L'AMPK favorise ainsi la captation et l'oxydation du glucose et des acides gras dans les muscles cardiaques et squelettiques, et inhibe la synthèse des acides gras au niveau du foie et des adipocytes, la lipogenèse du tissu adipeux, la synthèse du cholestérol et la néoglucogenèse dans le foie. L'AMPK agit sur les cellules  $\beta$  pancréatiques et inhibe ainsi la sécrétion d'insuline. L'AMPK contrôle également l'apport énergétique alimentaire via son action au sein des cellules hypothalamiques.

L'activation de l'AMPK par l'adiponectine joue ainsi un rôle important dans la régulation du métabolisme énergétique, à la fois par ses effets périphériques et centraux.

#### c. Les PPARs

Les récepteurs nucléaires activés par les proliférateurs de peroxysomes, PPARs, font partie d'une famille regroupant les récepteurs aux hormones stéroïdes et thyroïdiennes, à la vitamine D3 et au rétinoïdes. Ils existent trois isoformes majeures chez l'homme :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Chacune possède un domaine C-terminal, qui est le domaine de liaison avec le ligand et un domaine N-terminal, possédant une fonction indépendante du ligand.

Chacune de ces isoformes peut se distinguer par sa distribution tissulaire, la nature de son ligand et son rôle fonctionnel. Ainsi, PPAR $\alpha$  régule les gènes clés du métabolisme lipidique et participe au contrôle de l'inflammation, PPAR $\beta$  est impliqué dans l'embryogénèse et la différenciation des kératinocytes, et PPAR $\gamma$  est impliqué dans le stockage lipidique, la différenciation des adipocytes et le contrôle de l'inflammation.

#### d. RAS/MAPK

Les MAP kinases sont une famille de protéines constituée de trois sous-familles : les kinases JNK (c-jun N-terminal kinase), les kinases p38, et les kinases ERK.

Cette voie de signalisation régule plusieurs processus cellulaires dont la prolifération, la différenciation, la réponse au stress cellulaire et la survie cellulaire (Avruch 2007).

e. Les céramides

Les céramides sont des lipides mineurs composés d'une base à longue chaîne, sphingosine, lié à un acide gras par une liaison amide. Ce sont des constituants des sphingolipides, et sont produits au cours de leur catabolisme. Ils sont dans un premier temps transformés en sphingosine grâce à l'action de la céramidase, puis en sphingosine-1-phosphate (S1P) par la sphingosine kinase.

Les céramides provoquent une résistance à l'insuline via l'inhibition de la protéine kinase B (PKB/Akt) (Mahfouz et al. 2014). Enfin, la S1P induit la prolifération cellulaire et inhibe l'apoptose.

f. NF- $\kappa$ B

Les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B partagent un domaine N-terminal homologue Rel (RHD), qui permet la liaison à l'ADN. L'induction d'un stimulus déclenche l'activation du complexe IKK, entraînant la phosphorylation, l'ubiquitination et la dégradation des protéines I $\kappa$ B. Les dimères NF- $\kappa$ B ainsi libérés sont ensuite activés permettant l'induction des gènes cibles, impliqués notamment dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire.

L'activation de la voie des NF- $\kappa$ B est également impliquée dans le système immunitaire, dans le contrôle de la transcription de cytokines et d'effecteurs antimicrobiens. L'activation de la voie entraîne aussi une surexpression de la chaîne lourde de la ferritine et d'autres gènes cibles de NF- $\kappa$ B comme la superoxyde dismutase manganèse (mnSOD) et la nitrique oxyde synthase inductible (iNOS), pouvant expliquer la protection contre le stress oxydatif par l'adiponectine (Van Berendoncks and Conraads 2011).

D. Impact de l'activité physique sur l'adiponectine et ses effets

Tout comme l'activité physique, l'adiponectine est associée à une diminution des risques des maladies métaboliques chroniques et cardiovasculaires et, à l'échelon de l'organisme, d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline, d'une plus grande capacité à oxyder les lipides, et d'effets anti-inflammatoires et anti-athérogènes. De ce fait associé à des cibles cellulaires en partie communes, de nombreuses études ont examiné les effets de l'activité physique sur les taux

circulants d'adiponectine et sur ses effets. Cependant les liens entre l'activité physique et adiponectine sont assez complexes et encore incomplètement élucidés.

Alors qu'une grande majorité des études ne montre aucun effet de l'activité physique sur les taux circulants d'adiponectine (Hayashino et al. 2014), certaines mettent en évidence soit une diminution soit une augmentation de ces taux (Simpson and Singh 2008; Bouassida et al. 2010; Golbidi and Laher 2014). Cette contradiction apparente entre les études peut s'expliquer par de nombreux facteurs, à commencer par les changements de composition corporelle pouvant être induits par l'activité physique (dont on connaît les effets directs sur l'expression de l'adiponectine au niveau du tissu adipeux), mais également la spécificité des populations étudiées, les caractéristiques des exercices pratiqués (type, intensité, durée), ou encore les formes d'adiponectine étudiées. Des études plus récentes et moins nombreuses suggèrent qu'au-delà d'un effet sur les effets circulants d'adiponectine, l'activité physique pourrait également moduler la sensibilité tissulaire à cette hormone

*1. Effets de l'exercice sur la composition corporelle, le principal facteur de confusion des effets chroniques de l'activité physique sur l'adiponectine plasmatique*

L'adiponectine étant inversement corrélée à la masse grasse, si un protocole d'intervention physique provoque une diminution du poids corporel et/ou modification de la composition corporelle, l'effet propre de l'activité physique sur l'adiponectine circulante peut difficilement être évalué ou être confondu avec celui de la perte de poids.

La plupart des études montrant une augmentation de l'expression de l'adiponectine dans la circulation en réponse à l'exercice correspondent à des interventions ayant induit une diminution de la masse grasse des sujets.

Shadid et al. (2006) ont notamment montré que des adultes obèses, de type androïde, insulino-résistants ou non, ont diminué leur masse grasse viscérale et ont amélioré leur sensibilité à l'insuline et leurs profils d'adiponectine, après 19 semaines d'intervention sur l'exercice et le régime alimentaire. Dans une autre étude, chez des sujets présentant une obésité sévère (IMC :  $45.8 \pm 1.9 \text{ kg/m}^2$ ), un programme de 15 semaines combinant exercice et régime alimentaire hypocalorique a permis de réduire leur poids corporel et des marqueurs de l'inflammation, et d'augmenter la sensibilité à l'insuline et l'adiponectine plasmatique (Bruun et al. 2006). Les changements d'alimentation combinés avec l'exercice augmentent ainsi

les taux circulants d'adiponectine de façon concomitante avec une diminution de la masse grasse, dans l'obésité sévère. Il est probable que l'augmentation de l'adiponectine circulante dans ces interventions n'explique pas, à elle seule, les améliorations métaboliques associées à l'exercice physique et à la perte de poids. Ainsi dans une étude chez des sujets âgés obèses ( $63 \pm 1$  an), ayant suivi 12 semaines d'entraînement aérobie, les taux plasmatiques d'adiponectine n'étaient pas modifiés malgré une diminution significative de la masse grasse viscérale et une amélioration de la sensibilité à l'insuline (O'Leary et al. 2006).

Dans les études, plus rares, où l'intervention sur l'activité physique n'induit pas de changement du poids et/ou de la composition corporelle, les taux circulants d'adiponectine ne sont généralement pas modifiés, voire même paradoxalement diminués dans quelques études.

Nassis et al. (2005) ont notamment montré qu'après 12 semaines d'exercice aérobie mais sans changement du poids corporel ou de la masse grasse, des adolescentes obèses ont amélioré leur sensibilité à l'insuline bien qu'en parallèle les taux circulants d'adiponectine n'aient pas changé. L'interrelation des effets de l'activité physique et de la variation du poids corporel des sujets sur les taux d'adiponectine est illustrée dans l'étude de Christiansen et al. (2010). Ces auteurs s'intéressent aux effets d'une restriction calorique et de l'activité physique, utilisés seuls ou en combinaison, sur le poids et sur l'adiponectine circulante. Dans cette étude, la restriction calorique seule ou avec l'activité physique, a induit une perte de masse corporelle de 13% et induit une augmentation des concentrations plasmatiques d'adiponectine. En revanche, l'intervention sur l'activité physique, seule, induisant seulement 3,5% de diminution du poids corporel, n'a pas modifié les concentrations plasmatiques.

Ces différents résultats suggèrent donc que l'augmentation des taux plasmatiques d'adiponectine en réponse à l'activité physique, pourrait être la conséquence de la diminution de la masse grasse induite par les protocoles d'exercice plutôt qu'à un effet propre de l'activité physique.

Quelques études, telles que celles d'Ibanez et al. (2010) ont à l'inverse montré que des femmes obèses soumises à un entraînement d'exercice en résistance de 16 semaines, combiné avec une restriction calorique, ont diminué leurs taux plasmatiques d'adiponectine de façon un peu paradoxale au regard de l'amélioration de la sensibilité à l'insuline observée chez des sujets.

De façon similaire, l'entraînement de type aérobie chez des patients présentant une insuffisance cardiaque chronique entraîne également une diminution des concentrations plasmatiques d'adiponectine, et une amélioration de la sensibilité à l'adiponectine via l'activation de ses récepteurs dans le muscle et de son effecteur AMPK (Van Berendoncks et al. 2011).

## 2. *Effets de l'exercice aigu sur l'adiponectine plasmatique*

La pratique de l'activité physique en aigu engendre un stress dans l'organisme, qui met en place différentes adaptations physiologiques lorsque la pratique devient chronique.

Les effets de l'activité physique, pratiquée en aigu, sur les niveaux d'adiponectine semblent variés selon le niveau d'activité physique des sujets avant étude.

Une étude chez des sportifs de haut niveau de sexe masculin montre que les taux circulants d'adiponectine sont diminués immédiatement après l'exercice (un test de 6000m sur un rameur ergomètre) et augmentés après une période de 30 minutes de récupération, après ajustement sur les changements de volume plasmatique (Jurimae et al. 2005). Dans une étude ultérieure, ces mêmes auteurs ont examiné les changements en aigu de l'adiponectine en réponse à 6500m d'aviron réalisé au seuil anaérobie chez des sportifs. Les concentrations circulantes d'adiponectine n'étaient pas modifiées immédiatement après l'exercice mais augmentées après 30 minutes de récupération (Jurimae et al. 2006a). Les concentrations d'adiponectine sont ainsi modifiées en aigu en réponse à des exercices intenses chez les sportifs de haut niveau.

En revanche, plusieurs études menés chez des sujets qui n'étaient pas des sportifs de haut niveau, et examinant les effets de l'exercice pratiqué sur de courtes durées (course et cyclisme) sur les concentrations circulantes d'adiponectine n'ont pas observé de changement (Kraemer et al. 2003; Ferguson et al. 2004). De plus, chez des sujets actifs, mais pas sportifs de haut niveau, de sexe masculin ayant réalisé deux sessions d'exercice aérobie de longue durée, 120 minutes à 50% de leur capacité maximale d'exercice, aucun changement non plus dans les concentrations circulantes d'adiponectine après exercice et lors de la récupération n'a été observé (Jurimae et al. 2006b).



Les effets de l'exercice en aigu semblent également dépendre du poids corporel des sujets. Contrairement aux sujets en bonne santé chez lesquels aucun changement n'est observé avec l'activité physique, la pratique d'exercice en aigu augmente les concentrations plasmatiques d'adiponectine (+260% par rapport aux valeurs en basal) chez des sujets en surpoids, et ce sans changement du poids corporel (Kriketos et al. 2004).

### 3. *Exercice et adiponectine tissulaire*

Les variations d'adiponectine observées dans certaines études en réponse à l'exercice peuvent peut-être s'expliquer par des variations de son expression dans les tissus, *i.e.* sa synthèse. Toutefois, de la même façon que pour les taux plasmatiques, les variations du niveau d'expression de l'adiponectine dans le tissu adipeux observées en réponse à l'activité physique, semblent être en grande partie liés aux effets de l'activité physique sur la masse grasse. Ainsi, Lakhdar et al. (2014) ont examiné l'effet d'un entraînement aérobique de 6 mois, seul ou combiné avec une restriction calorique, sur l'adiponectine circulante et dans le tissu adipeux, chez des sujets obèses de sexe féminin. Ils ont montré que les niveaux d'expression de l'adiponectine dans le tissu adipeux augmentaient dans les deux groupes, de façon concomitante avec l'augmentation des taux plasmatiques d'adiponectine et une diminution du poids corporel des sujets. Cependant, dans une étude réalisée chez des femmes obèses, ayant suivi un programme d'entraînement aérobique de 3 mois, les concentrations plasmatiques et tissulaires (tissu adipeux) d'adiponectine n'étaient pas modifiées par l'intervention, malgré une diminution de la masse grasse (Polak et al. 2006).

La diminution de masse grasse observée dans ces études et induite par l'activité physique, permet peut-être de diminuer l'hypoxie et l'inflammation induite par l'obésité, et ainsi de rétablir l'expression de l'adiponectine via la stimulation de la voie des PPAR $\gamma$  et l'inhibition de la voie HIF-1 (Chen et al. 2006).

Van Berendoncks et al. (2011) ont examiné les effets d'un entraînement combinant exercices aérobique et en résistance sur des patients de sexe masculin atteints d'insuffisance cardiaque chronique. Ces patients sont caractérisés par des taux circulants d'adiponectine et des niveaux d'expression musculaires de son gène augmentés par rapport à la normale, et à l'inverse des niveaux d'expression musculaires de son récepteur AdipoR1 diminués. L'entraînement physique chez ces patients a permis de rétablir les concentrations musculaires de l'adiponectine et de

son récepteur AdipoR1 et d'améliorer le métabolisme lipidique et glucidique dans le muscle.

Chez le rat, Garekani et al. (2011) ont examiné les effets de différentes intensités d'exercice sur la concentration tissulaire d'adiponectine dans le tissu adipeux, le muscle et le foie. Les animaux ayant suivi un entraînement d'intensité moyenne et élevée présentaient des taux plasmatiques et une concentration d'adiponectine au niveau du tissu adipeux supérieurs aux rats n'ayant pas réalisé d'exercice, probablement, là encore, du fait d'une perte de masse grasse. Le niveau d'expression de l'adiponectine n'était pas différent dans le muscle et le foie.

Une étude a montré que des souris soumises à 15 jours d'exercice présentaient des concentrations d'adiponectine dans l'hippocampe augmentées par rapport à leurs congénères non soumises à l'exercice, sans changement des taux plasmatiques et adipeux de l'adiponectine (Yau et al. 2014).

#### 4. *Exercice et métabolisme de l'adiponectine*

Des variations de la clairance de l'adiponectine peuvent peut-être expliquer la variation de ses taux circulants en réponse à l'exercice. En effet, la clairance de l'adiponectine semble dépendre de sa biodisponibilité et de son activité. Les travaux d'Halberg et al. (2009) ont suggéré qu'une clairance rapide de l'adiponectine va de pair avec une forte biodisponibilité et bioactivité alors qu'une clairance retardée est un indicateur d'une dysfonction métabolique périphérique.

Auerbach et al. (2013) ont montré que l'entraînement de type endurance chez des sujets obèses a modifié la distribution des différentes formes d'adiponectine dans la circulation en faveur de la forme LMW, avec notamment une diminution de la forme HWM dans la circulation, indépendamment d'une perte de poids corporel. La forme HMW étant considérée comme la forme active de l'adiponectine, on peut supposer que la forme de HMW a vu sa clairance augmentée en réponse à l'entraînement dans cette étude.

#### 5. *Exercice et récepteurs à l'adiponectine*

L'adiponectine circulante et tissulaire étant régulées par l'activité physique, des effets comparables peuvent être attendus sur l'expression de ces récepteurs.

Dans leur étude comparant des interventions sur le régime alimentaire ou sur l'exercice, ou une combinaison des deux, Christiansen et al. (2010) ont montré

une augmentation de l'expression des récepteurs dans le tissu adipeux et le muscle squelettique dans les 3 types d'intervention, mais une modification des taux d'adiponectine circulante seulement lorsque l'intervention comprenait une composante de régime alimentaire et une perte de poids.

Dans le muscle squelettique, AdipoR1 active les voies de signalisation de l'AMPK et PPARs, qui sont des voies également activées par l'exercice. Certaines études récentes suggèrent que les effets bénéfiques de l'exercice pourraient en partie être liés à son impact sur les récepteurs à l'adiponectine et APPL1. Quelques études ont ainsi montré que l'exercice de longue durée augmente l'expression du gène de l'AdipoR1 dans le muscle et améliore la sensibilité à l'insuline chez les rats, normaux ou obèses (Chang et al. 2006; Zeng et al. 2007). Bluher et al. (2006) ont examiné l'adiponectine circulante et l'expression de ses récepteurs dans le muscle chez des sujets normaux ou présentant un diabète de type 2, avant et après 4 semaines d'entraînement physique (3 sessions par semaine), ayant induit une diminution du poids corporel et de la masse grasse. Ils ont montré que l'entraînement physique augmente les concentrations circulantes d'adiponectine et les niveaux d'expression de ses récepteurs dans le muscle. Sur un sous-groupe de 5 sujets, ils ont observé qu'une session intense de 3h d'exercice augmentait l'expression des ARNm des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 ainsi que la phosphorylation de l'AMPK et de l'ACC dans le muscle, mais aucun effet sur l'adiponectine circulante. Les niveaux d'expression des récepteurs dans le tissu adipeux sous-cutané ont également augmenté en réponse à l'entraînement physique de 4 semaines (Bluher et al. 2007). Le niveau d'expression viscéral et sous-cutané du récepteur AdipoR2 était corrélé avec l'adiponectine circulante, la sensibilité à l'insuline, le contrôle glycémique et les taux de lipides.

D'autres études chez la souris ont montré que l'exercice améliorait la sensibilité à l'insuline grâce à l'augmentation des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2, et de la protéine APPL1 dans les tissus hépatique, adipeux et du muscle squelettique (Farias et al. 2012; Marinho et al. 2012).

Ainsi, ces études suggèrent que l'expression des récepteurs à l'adiponectine est régulée dans différents tissus, comme le muscle squelettique et le foie, par l'activité physique, et permet ainsi une meilleure action de l'adiponectine, notamment pour améliorer la sensibilité à l'insuline ou l'oxydation des lipides.

## E. Questions en suspens

Les effets de l'activité physique sur la synthèse et les taux circulants d'adiponectine semblent variés selon l'intensité, le volume et la durée de l'intervention mais aussi probablement selon ses effets sur la masse grasse. Quelques études récentes, notamment chez des insuffisants cardiaques, suggèrent que l'activité physique pourrait également améliorer la sensibilité des tissus à l'adiponectine, via ses récepteurs, et permettre ainsi une amélioration de la signalisation de l'adiponectine et des fonctions métaboliques associées.

Cependant l'effet *per se* de l'activité physique n'est pas totalement élucidé. En effet, parmi les études visant à étudier les effets de l'exercice sur l'adiponectine, plasmatique ou tissulaire, beaucoup montrent une variation du poids corporel ou de la masse grasse des sujets (animal ou humain), qui est un paramètre important de l'expression de l'adiponectine. Afin d'éclaircir ces résultats, il est nécessaire d'étudier les effets de l'exercice indépendamment de toute variation de poids des sujets, sur les taux plasmatiques et tissulaires de l'adiponectine, ainsi que de ses récepteurs. Une autre question dans les études disponibles a trait aux dosages utilisés pour mesurer les taux circulants d'adiponectine, certaines études reposant sur le dosage de l'adiponectine totale et non de sa forme active de haut poids moléculaire.



### III. MicroARNs et activité/inactivité physique

#### A. Généralités

Chez les eucaryotes, les gènes sont régulés de façon positive ou négative à différentes étapes de l'expression, au niveau chromatinien par méthylation ou acétylation de l'ADN, au niveau transcriptionnel via des facteurs de transcription, au niveau post-transcriptionnel via notamment l'épissage alternatif ou les microARNs et au niveau post-traductionnel par modification de la structure des protéines.

Parmi les régulateurs de l'expression des gènes, les microARNs (miARNs) forment une sous-famille parmi les petits ARNs et participent à l'interférence ARN ou RNA silencing. Ce mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes est impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques, tels que le développement embryonnaire, la différenciation et prolifération cellulaire ou encore le métabolisme. On estime que les microARNs réguleraient environ 60 % des gènes codant pour des protéines chez l'homme (Friedman et al. 2009).

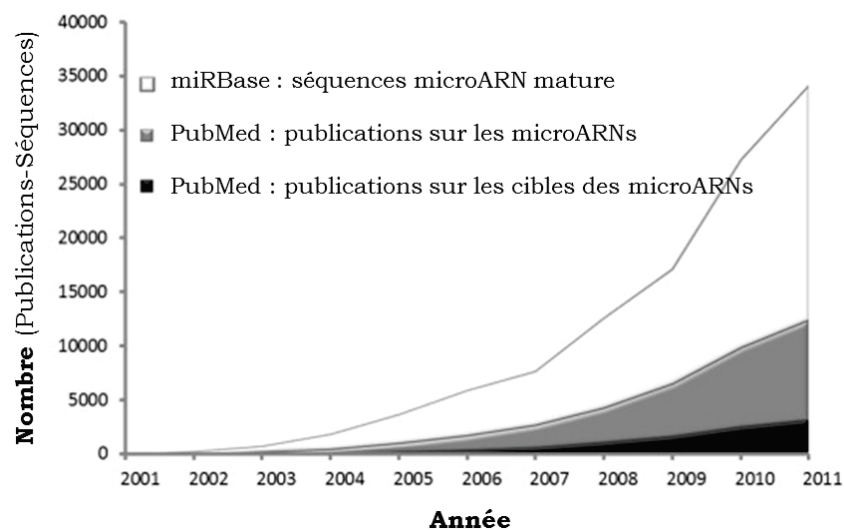
Les miARNs sont exprimés par toutes les cellules eucaryotes, et représentent à ce jour la classe la plus abondante de petits ARNs décrite chez les mammifères. On estime notamment que plusieurs centaines de gènes codent pour des miARNs chez les invertébrés, et que cela atteint plusieurs milliers chez les plantes et vertébrés. Chaque miARN est capable de se fixer à un ou plusieurs ARN messagers (ARNm) cibles et contrôle ainsi les niveaux d'expression des protéines de ces ARNm. Ils réguleraient ainsi une très large proportion du transcriptome.

#### 1. *Un peu d'histoire*

Les microARNs ont été découverts récemment, en 1993, chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Lee et al. 1993). Dans cette étude, les auteurs ont découvert que le gène *lin-4*, un répresseur de *lin-14* impliqué dans le développement larvaire, ne codait pas pour une protéine mais codait notamment pour un petit ARN de 22 nucléotides présentant plusieurs sites de complémentarité dans la région 3' non codante des ARNm codant pour la protéine *lin-14*. La complémentarité de ce petit ARN permet l'association entre *lin-4* et *lin-14* réprimant ainsi *lin-14*. A l'époque, cette découverte avait été considérée comme une particularité du développement des nématodes.

Ce n'est que 7 ans plus-tard que les microARNs ont été reconnus comme une classe distincte de régulateurs, grâce à la découverte d'un nouveau miARN également chez *C. elegans* (Reinhart et al. 2000). Ils ont ainsi identifié un miARN de 21 nucléotides, let-7, qui se fixe sur la région 3' non codante des ARNm codant pour la protéine lin-41 empêchant sa synthèse.

Par la suite, des milliers de microARNs ont été identifiés chez les invertébrés, les plantes et les vertébrés, enrichissant d'année en année la banque de donnée de séquences de microARNs miRBase (Figure 11). Ainsi, au jour d'aujourd'hui ce sont 2588 miRNAs qui ont été décrits chez l'homme, 1915 chez la souris et 765 chez le rats, 434 chez *C. elegans* ou encore 427 chez *Arabidopsis thaliana* (Kozomara and Griffiths-Jones 2014). Au cours des dix dernières années le nombre de publications, référencées dans PubMed, portant sur les microARNs ainsi que leurs cibles n'ont cessé de croître (Figure 11). Rapidement, de nombreuses études ont permis notamment de comprendre les différentes étapes de leur biosynthèse ainsi que leurs implications biologiques.



**Figure 11. Augmentation exponentielle du nombre de travaux de recherches sur les microARNs.** Depuis 2003 le nombre de séquences matures de microARN déposées dans la base de données miRBase, le nombre de publications dans PubMed sur les microARNs et le nombre de publications dans PubMed s'intéressant aux cibles des microARNs ont fortement augmenté.

*D'après Reyes-Herrera and Ficarra (2012)*

## 2. Identification des microARNs et de leurs cibles

L'identification des microARNs repose principalement sur la prédiction des gènes codants pour ces petits ARNs réalisée par analyses bioinformatiques. Les microARNs présentent des séquences très conservées entre les espèces et une structure théorique bien particulière qui permettent d'évaluer si une séquence

spécifique peut correspondre à un microARN. Ces analyses n'étant pas parfaites, un microARN prédit doit être validé expérimentalement. La base de données miRBase (Kozomara and Griffiths-Jones 2014) recense tous les microARNs validés.

L'identification des cibles des microARNs repose également sur des analyses bioinformatiques fondées également sur des critères spécifiques du gène cible, comme une très forte conservation de séquence du site d'appariement entre espèces ou le fait que l'extrémité 5' (la tête) du microARN présente un fort appariement à l'ARNm. De la même façon, une cible prédite doit être validée par analyses expérimentales. Il existe en effet de nombreux faux positifs, avec une estimation d'environ un seul site prédit sur 10 étant validé.

De plus, une fois les cibles d'un microARN validées il convient ensuite d'étudier le rôle régulateur de ce microARN. L'approche principalement utilisée est l'inhibition de son activité, soit par délétion du gène codant pour le microARN (genetic knockout, KO), soit par liaison avec une séquence inhibant l'action du microARN, et d'examiner les conséquences.

## B. Biosynthèse des microARNs

La biosynthèse des microARNs est un processus cellulaire qui se déroule en plusieurs étapes, initié dans le noyau et finalisé dans le cytoplasme. Les microARNs sont produits à partir de précurseurs de plus grande taille qui subissent une succession de clivages catalysés par des enzymes permettant de produire les microARNs matures (O'Carroll and Schaefer 2013). Les microARNs (miARNs) matures sont de petits ARN simple brin non codant d'une longueur moyenne de 22 nucléotides, dépourvus de queue poly(A) et de coiffe protectrice en 3' (cap).

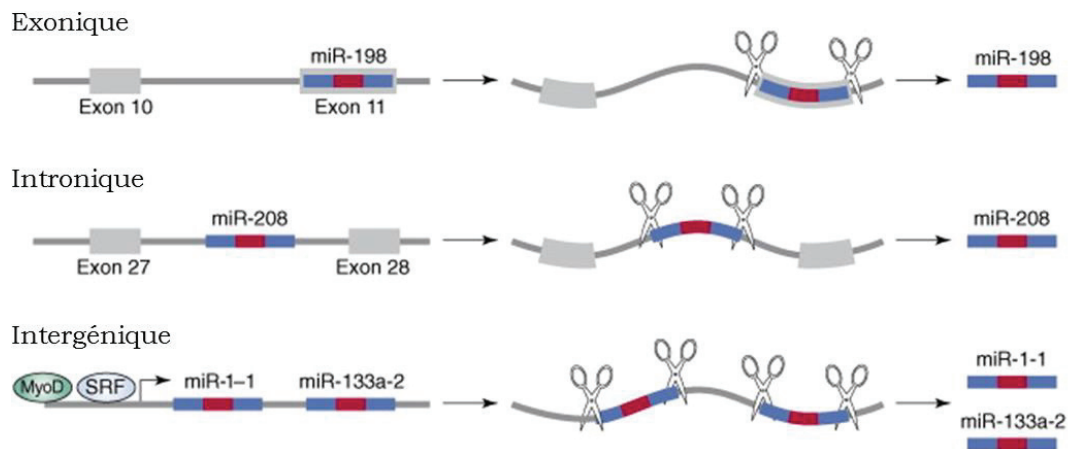
### 1. *Organisation génomique des microARNs*

Chez l'homme, les gènes codants pour les microARNs sont présents sur tous les chromosomes, à l'exception du chromosome Y. Dans un premier temps, il était pensé que la localisation des miARNs était exclusivement intergénique, mais plusieurs études ont montré que leur localisation était en fait dans des unités de transcription bien spécifiques. Les gènes codants pour les microARNs peuvent être classés selon leur localisation génomique : les microARNs exoniques, introniques ou intergéniques (Figure 12) (Rodriguez et al. 2004; Zhao and Srivastava 2007).

Environ 10% des microARNs sont codés à partir de séquences intégrées ou chevauchant des exons. Ils sont généralement orientés comme le gène hôte, et



proviennent soit de la région 5' ou 3' UTR non codante, par exemple miR-198 intégré au gène codant pour la follistatin-like1 FLST1 (Figure 12).



**Figure 12. Organisation génomique des microARNs.** Les microARNs peuvent être classés selon la localisation génomique de leur séquence codante : les microARNs exoniques, introniques ou intergéniques. Suite à la transcription, l'épissage libère un ou des pré-miARNs et ARNm mature.

*D'après Zhao and Srivastava (2007)*

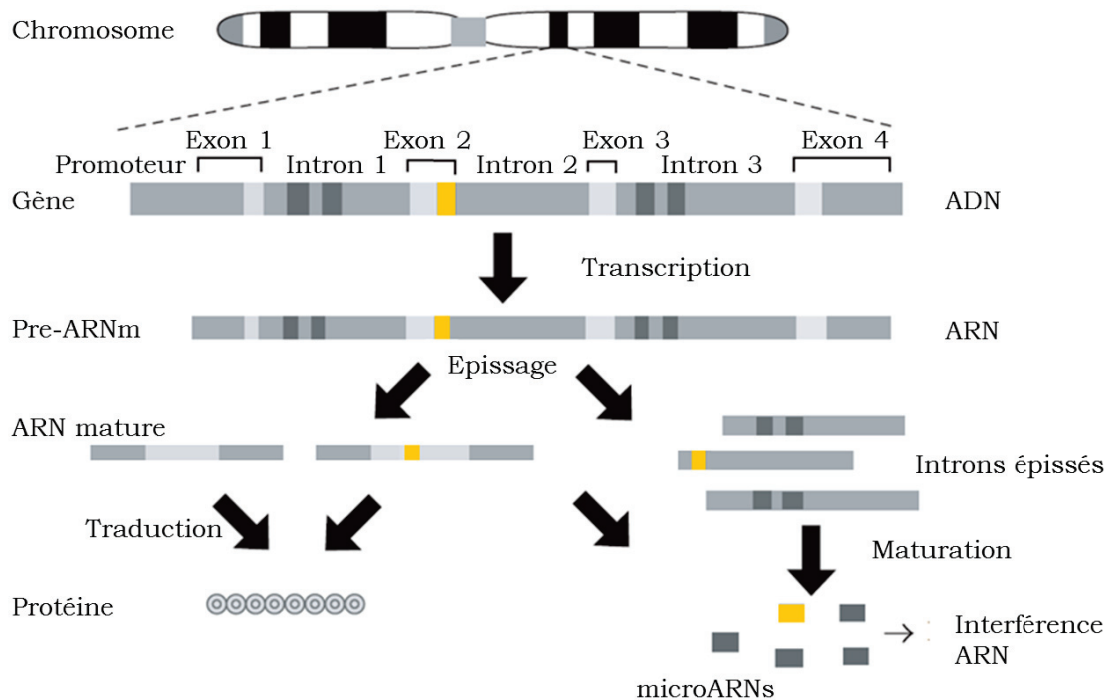
Environ la moitié des microARNs connus sont localisés dans des introns d'unités de transcription codante pour des protéines ou non codantes, et sont appelés mitrons. Dans l'étude de Rodriguez et al. (2004), sur 117 miARNs étudiés, 27 microARNs étaient des introns d'ARN non codant et 90, soit 72%, étaient des introns de gènes codants pour des protéines. Généralement les séquences codantes pour les microARNs introniques sont dans la même orientation que leur gène hôte et font partie du transcrit primaire de celui-ci. Par exemple, miR-208, qui est spécifiquement exprimé dans le tissu cardiaque chez l'homme et la souris, est intégré à l'intron 28 du gène codant pour la protéine  $\alpha$ -myosin heavy chain MHC- $\alpha$ . Les précurseurs des micro-ARNs sont ensuite produits par clivage lors de l'épissage de l'intron (Figure 12). Dans l'étude de Monteys et al. (2010), les auteurs prédisent que 35% des microARNs introniques posséderaient leurs propres promoteurs, et pourraient ainsi être régulés de façon indépendante au gène hôte.

Certains microARNs sont intergéniques (20%). Du à leur localisation dans des séquences d'ADN non transcrites, ils sont régulés par des éléments de régulation de la transcription qui leurs sont spécifiques, notamment promoteurs et signaux de terminaison. Par exemple miR-1-1 et miR-133a-2 qui sont des miRNAs spécifiques du muscle, sont régulés par les facteurs de transcription serum-response-factor (SRF) et myogenic differentiation 1 (MyoD1). Ils peuvent également

être localisés dans des introns mais présentent alors une orientation anti-sens (Zhao and Srivastava 2007).

Dans l'étude de Rodriguez et al. (2004), 14 microARNs sur les 161 étudiés, soit 8% environ, avaient une distribution mixte, *i.e.* selon l'épissage alternatif leur localisation était soit exonique soit intronique (Figure 13).

Le reste des microARNs dérivent de séquences d'ADN répétées.

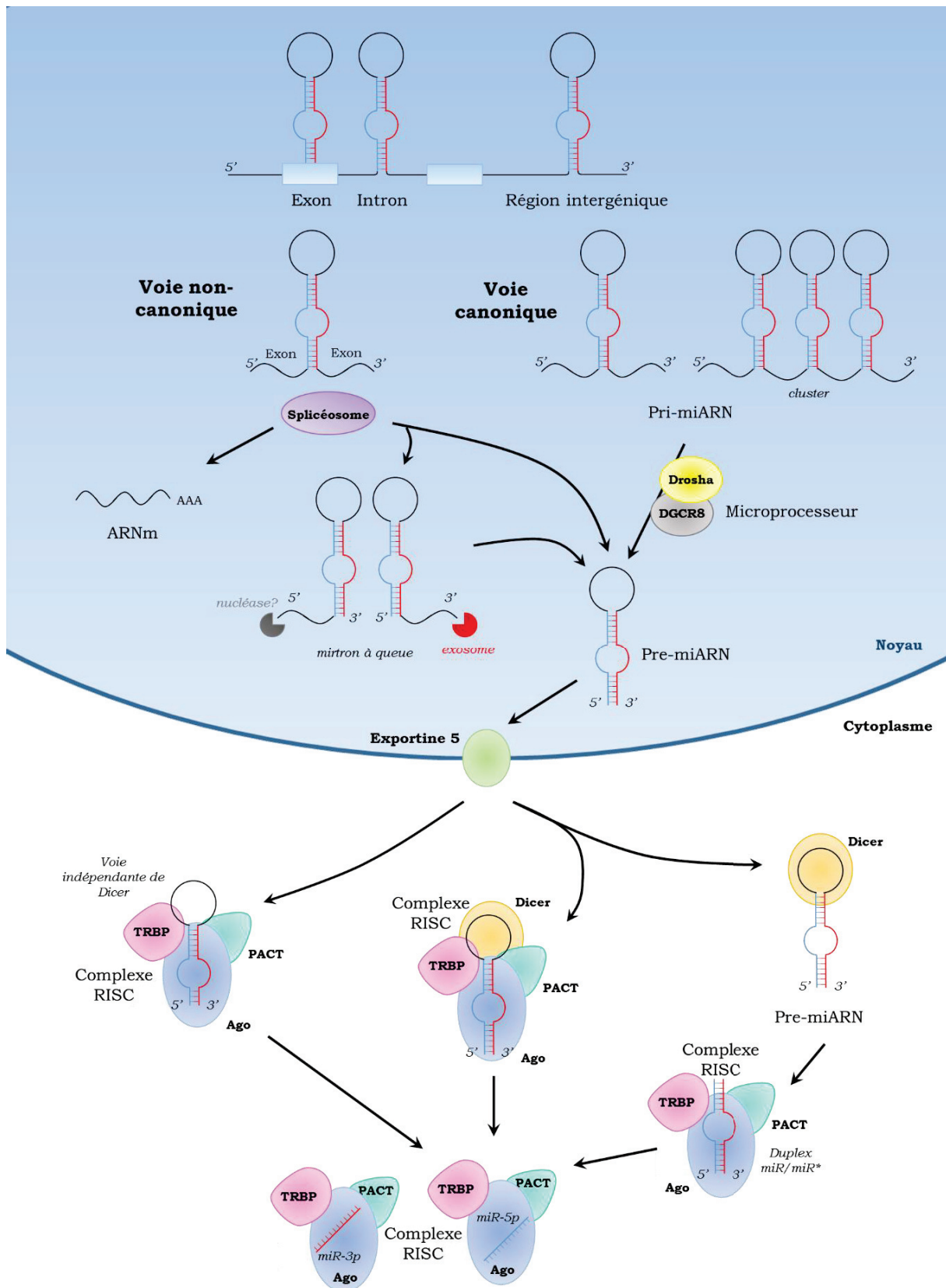


**Figure 13. Biosynthèse des microARNs introniques à distribution mixte.** Le microARN mature est synthétisé soit par épissage d'un intron soit par excision de l'exon.  
D'après Lin et al. (2006)

Par ailleurs, le locus d'un microARN peut correspondre à un gène unique ou à un groupe de gènes de microARNs, on parle alors de cluster. Chez les mammifères, environ 30 à 50 % des microARNs sont regroupés en cluster. Lors de la transcription, un seul pri-miARN, transcrit primaire des microARNs, est produit, puis lors de la maturation, les différents microARNs matures sont libérés (Williams 2008).

## 2. Transcription des microARNs

Les microARNs sont synthétisés selon deux types de voies, la voie canonique et la voie non-canonique qui permettent d'aboutir à une molécule finale de 22 nucléotides en moyenne (Figure 14).



**Figure 14. Représentation schématique des voies de synthèses canonique et non canonique des microARNs.** AGO, protéine argonaute; DGCR8, DiGeorge syndrome critical region 8; miR, microARN; PACT, protein activator of the interferon-induced protein kinase; Pre-miARN, précurseur de microARN; Pri-miARN, transcript primaire de microARNs; TRBP, Transactivation response RNA binding protein; RISC, RNA-induced silencing complex.

*D'après Westholm and Lai (2011) et O'Carroll and Schaefer (2013)*

#### a. Voie canonique

Dans la voie canonique, la synthèse des microARNs commence par la transcription de transcrits primaires, les pri-miARNs, longs de plusieurs centaines à milliers de nucléotides, par l'action d'une ARN polymérase à partir du promoteur du gène hôte et/ou spécifique du microARNs. L'ARN polymérase est majoritairement l'ARN pol II, mais 5% des microARNs introniques dépendraient de promoteurs dépendants de l'ARN pol III (Monteys et al. 2010).

La structure secondaire des pri-miARNs contient généralement une structure secondaire en boucle, dite en épingle à cheveux d'environ 80 nucléotides, et de façon similaire à un ARNm, une coiffe à l'extrémité 5' et une queue poly-adenylée à l'extrémité 3'. Comme mentionné précédemment, lors de la transcription d'un cluster de miARNs, un seul pri-miARN est synthétisé qui peut alors contenir plusieurs structures secondaires en épingle à cheveux (Cullen 2004).

Une fois le transcrit primaire synthétisé par l'ARN polymérase, il est clivé en un précurseur, le pre-miARN. Le clivage est réalisé par la ribonucléase de type III Drosha en association avec le cofacteur DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8) chez l'homme, formant ainsi un complexe appelé microprocesseur. Ce cofacteur est essentiel car il aide Drosha à reconnaître son substrat et la fixation de l'ARN. Le site de clivage par Drosha dépend de la séquence et de la structure secondaire, en épingle à cheveux, du pri-miARN (Wahid et al. 2010).

A l'issue du clivage par Drosha, le pre-miARN est relativement instable et doit être rapidement transporté hors du noyau pour poursuivre sa maturation. L'exportation du pre-miARN dans le cytoplasme se fait par les pores nucléaires, par le biais d'un grand complexe protéique, l'exportine 5 (Kim 2004). Ce transport est actif, et nécessite certaines caractéristiques structurales du pre-miARN : une tige d'ARN supérieure à 16 paires de bases et une extension de deux nucléotides à son extrémité 3' (Zeng and Cullen 2004).

Une fois le pre-miARN dans le cytoplasme, il est clivé par la ribonucléase de type III Dicer produisant un duplex miARN-miARN de 22 nucléotides en moyenne. Dicer est une protéine très conservée au cours de l'évolution et à travers les taxons. Elle est composée de deux domaines ribonucléase III et d'un domaine de liaison aux ARN double brin. Cet ARN double brin est ensuite pris en charge par d'autres protéines comme TRBP (Transactivation response RNA-binding protein) et PACT (protein activator of the interferon-induced protein kinase) qui permettent le

recrutement d'une protéine argonaute Ago, formant ainsi le complexe RISC, RNA induced silencing complex qui permet de se lier à l'ARN cible (Lee et al. 2006). Elles ne sont pas indispensables pour le clivage du pre-miARN mais influence la formation et l'action du complexe RISC et améliore la stabilité du microARN et son interférence avec l'ARNm. Dans certains cas, Dicer fait partie du complexe RISC, et il n'y a alors pas de production de duplex.

Au sein du duplex, un brin correspond au microARN mature, ou miR mature et l'autre brin est appelé miR\*. Plusieurs études ont montré que certains miR\* ne sont pas systématiquement dégradés comme initialement suggéré, mais sont également fonctionnels. Aujourd'hui, miR-5p désigne le microARN du bras 5' de l'épingle à cheveux (miR mature) et miR-3p, le microARN du bras 3' (miR\*) (Kozomara and Griffiths-Jones 2014).

Le microARN fonctionnel se compose de cinq parties : l'ancre à l'extrémité 5' (base 1), la tête qui permet l'appariement à la cible (bases 2 à 8), une région centrale (bases 9 à 12), une région supplémentaire (bases 13 à 16) et la queue à l'extrémité 3' (base 17 à 22) permettant la reconnaissance de la cible (Khorshid et al. 2013).

#### b. Voies non-canoniques

La voie canonique est suivie par la majorité des microARNs, cependant il existe des variations à cette synthèse, appelées voies non-canoniques.

##### i. *Voie des mirtrons, indépendante de Drosha*

Lors de l'épissage du gène hôte des mirtrons, une structure semblable à un pre-miARN est libérée, qui peut ensuite poursuivre sa maturation via la voie canonique (Okamura et al. 2007). Cette voie ne nécessite donc pas l'action de Drosha dans le noyau.

Certains mirtrons présentent une extension non structurée, appelée queue, soit à l'extrémité 5' soit à l'extrémité 3' de l'épingle. Un clivage supplémentaire est ainsi nécessaire pour le transport par l'exportine 5 et le clivage par Dicer. La queue est retirée par un exosome, un complexe protéique capable de dégrader différents types de molécules d'ARN, pour les mirtrons à queue en 5', et probablement par une exonucléase pour les mirtrons à queue en 3' (Westholm and Lai 2011)

### ii. *Les microARNs dérivés des snoARNs*

Parmi les snoARNs (small nucleolar RNA), qui sont de petits ARNs nucléaires impliqués dans la maturation des ARNs ribosomiaux, certains présentent une activité similaire à celle d'un microARN. Ces dérivés de snoARNs sont clivés par Dicer, sans participation du complexe RISC. Ces « microARNs » ont été identifiés chez plusieurs organismes incluant l'Homme, et présente une grande conservation au cours de l'évolution. Leur ressemblance structurelle avec les microARNs suggère que ces deux molécules peuvent être homologues, *i.e.* partager un ancêtre commun (Ender et al. 2008).

### iii. *Les microARNs dérivés des shARNs*

D'autres dérivés des microARNs ont été identifiés, les shARNs (short hairpin RNA), qui sont des petits ARNs endogènes en épingle à cheveux. La maturation est assurée par des nucléases, encore non identifiées, puis par Dicer de la même façon que les snoARNs.

### iv. *Voie non-canonique indépendante de Dicer*

Certains microARNs particuliers, comme miR-451, ne nécessite pas l'intervention de la protéine Dicer dans leur processus de maturation. Le pri-miARN clivé par Drosha génère ici un pre-miARN plus court que la normal, qui ne peut servir de substrat à Dicer. La maturation est assurée par les autres cofacteurs du complexe RISC (Cheloufi et al. 2010) (Figure 14).

### c. Nomenclature des microARNs

Un microARN mature est nommé par les lettres miR, avec le R en majuscule, suivies d'un chiffre. La numérotation des microARNs est réalisée par ordre de découverte et d'intégration dans la banque internationale miRBase. Le nom du microARN peut être précédé de trois lettres correspondant à l'organisme dans lequel a été décrit le microARN, par exemple *hsa* pour l'homme ou *dme* pour *D. melanogaster*. Le nom peut également être suivi des suffixes 5p ou 3p lorsque le microARN provient respectivement du bras 5' ou du bras 3' de l'épingle à cheveux. Le précurseur du microARN possède la même dénomination, à la différence que mir s'écrit avec un r minuscule et l'absence du suffixe désignant le brin. Le gène codant

pour le microARN aura le même nom que le pre-miARN mais écrit dans une police italique.

Pour exemple, le microARN mature hsa-miR-148b-3p a pour précurseur hsa-mir-148b et pour gène *hsa-mir-148b*.

### C. Régulations de l'expression des microARNs

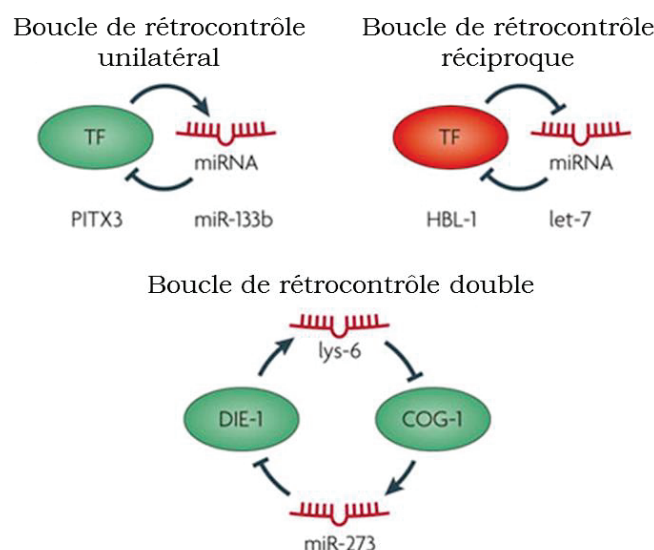
Les microARNs sont des régulateurs essentiels du fonctionnement des cellules. Une altération de leur expression pouvant causer des pathologies, ils sont finement régulés pendant leur biogénèse mais également dans leur fonctionnement.

#### 1. *Régulation des gènes codants pour les microARNs*

La transcription des gènes codants pour les microARNs est régulée de façon similaire à ceux codants pour des protéines. Les ARN polymérase II et III n'ayant pas les mêmes propriétés et reconnaissant des promoteurs et éléments de terminaison spécifiques, la régulation de l'expression des microARNs peut être réalisée de différentes façons.

Les promoteurs des gènes codants pour les microARNs sont sous le contrôle de facteurs de transcription pouvant favoriser ou inhiber l'expression des microARNs selon les tissus ou le stade de développement (Krol et al. 2010).

Chaque microARN appartenant à un cluster génomique peut également être transcrit et régulé de façon indépendante.



**Figure 15. Boucles de rétrocontrôle de l'expression des microARNs.** Le microARN peut inhiber le facteur de transcription qui le régule positivement ou négativement, les rétrocontrôles sont alors respectivement unilatéraux ou réciproques. La boucle de rétrocontrôle peut également être double : un microARN inhibe le facteur de transcription régulant positivement un autre microARN inhibiteur du facteur de transcription du premier microARN.

*D'après Krol et al. (2010).*

L'expression des microARNs est également régulée via des boucles de rétrocontrôle, dans lesquels ils sont très impliqués (Figure 15). En effet, de nombreux microARNs peuvent réguler les 48 facteurs de transcriptions impliqués dans la biogénèse et la fonction de ces mêmes microARNs. Les rétrocontrôles peuvent être unilatéraux, réciproques ou doubles avec des facteurs de transcription spécifiques. Par exemple, miR-133b et le facteur de transcription PITX3 (Paired-like homeodomain 3) forment une boucle de rétrocontrôle négatif où PITX3 est un activateur et miR-133b un inhibiteur (Krol et al. 2010).

## 2. Régulation de la maturation des microARNs

Comme on a pu le voir précédemment, la maturation des microARNs est un mécanisme complexe avec de nombreux acteurs et étapes, et diffère selon la localisation des microARNs (exonique, intronique, intergénique). De ce fait, les modes de régulation de la maturation des microARNs sont variés.

Si on s'intéresse aux étapes principales de maturation, on peut examiner la régulation du clivage par le microprocesseur, constitué de Drosha et DGCR8. Au sein de ce complexe, la protéine DGCR8 a un effet stabilisateur sur Drosha qui contrôle les niveaux de DGCR8 par clivage de son ARNm induisant sa dégradation (Han et al. 2009). La régulation du niveau d'expression et de l'activité de ces protéines va ainsi moduler l'accumulation des pre-miARNs.

De la même façon que pour le microprocesseur, les protéines composant le complexe RISC vont se réguler les unes et les autres. L'accumulation de Dicer dépend notamment de TRBP dont l'augmentation entraîne une déstabilisation de Dicer et une altération dans le traitement des pre-miARNs (Chendrimada et al. 2005).

La composition nucléotidique des extrémités 5' et 3' d'un microARN est déterminée par la localisation du clivage par le complexe RISC. Ce procédé n'étant pas uniforme, les microARNs générés peuvent avoir des extrémités différentes, ils sont alors considérés comme des isoformes. Si l'hétérogénéité à l'extrémité 5' touche la tête du microARN, cela peut modifier les cibles du microARN et ainsi modifier ses fonctions biologiques (Krol et al. 2010).

Plusieurs études ont également montré que les microARNs pouvaient être régulés par le mécanisme d'édition, qui est une modification post-transcriptionnelle de la séquence d'un ARN par addition, remplacement ou modification de



nucléotides. Selon le lieu de son action, l'édition peut donc altérer la maturation du microARN entraînant alors rapidement une dégradation du pri ou pre-miARN (Kawahara et al. 2008).

#### D. Mécanismes d'action des microARNs

Les microARNs sont des régulateurs de l'expression génique. Généralement, ils régulent négativement l'expression des gènes, soit par dégradation de l'ARNm soit par inhibition de sa traduction, mais ils peuvent également favoriser l'expression génique.

##### 1. *Reconnaissance de l'ARNm*

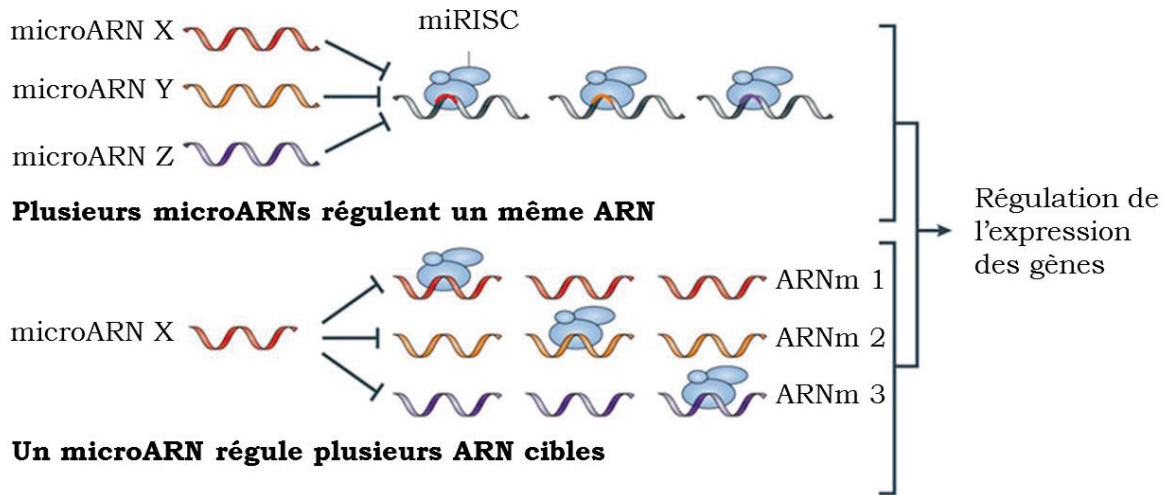
Une fois le microARN mature pris en charge dans le complexe RISC, il peut interagir avec son ARNm cible et son mode d'action va dépendre de leur degré de complémentarité, mais également d'autres facteurs comme le type de protéines Ago, la composition des ribonucléoprotéines entrant en jeu et l'action du promoteur du microARN.

Au cœur du complexe RISC se trouvent des protéines de la famille Argonaute (Ago) qui se lient au microARN mature et permettent de faciliter la reconnaissance de l'ARNm cible. Chez les mammifères, quatre protéines Ago, de 1 à 4, interviennent dans les interactions avec les microARNs, et seule Ago2 présente une activité d'endonucléase et permet donc de cliver les ARNs (Liu et al. 2004).

Les microARNs se composent de 5 parties dont 2 essentielles : la tête (bases 2 à 8) cruciale pour l'appariement avec l'ARNm et la queue (bases 17 à 22) à l'extrémité 3' permettant la reconnaissance de la cible. La tête est la région la plus conservée des microARNs chez les métazoaires car un appariement parfait de cette région est indispensable à l'activité du microARN. Cependant cette règle n'est pas absolue, et certains mésappariements peuvent avoir lieu l'efficacité de l'interaction étant alors largement diminuée.

L'appariement du microARN à son ARNm cible peut être parfait mais il est généralement incomplet, et le duplex microARN/ARNm présente alors une ou plusieurs boucles au niveau de la partie centrale du microARN (bases 9 à 12).

De nombreux microARNs dans le génome possèdent la même séquence tête. Les appariements étant généralement imparfaits, un ARNm peut alors être la cible de plusieurs microARNs, et un microARN peut réguler plusieurs cibles (Figure 16). Les interactions microARN/ARNm cible forment ainsi un réseau de régulation génique assez complexe.



**Figure 16. Réseau de régulation des ARNm cibles par les microARNs.** Un ARNm peut être la cible de plusieurs microARNs (par exemple microARNs X, Y et Z). De façon similaire, chaque microARNs peuvent réguler plusieurs ARNm cibles (par exemple ARNm 1, 2 et 3).

*D'après Baumjohann and Ansel (2013).*

Les sites d'hybridation des microARNs sur les ARNm cibles se trouvent majoritairement dans leur région 3' non codante, et plus rarement au niveau des ORFs (opening reading frame) et des régions 5' non codantes (Schnall-Levin et al. 2010).

La capacité du microARN à s'apparier à son ARNm cible dépend également de la structure secondaire de la cible, notamment de l'accessibilité de la séquence cible. Ainsi de fortes structures secondaires à proximité du site cible peuvent limiter l'accès au complexe miARN-RISC et empêcher l'interaction du microARN avec son ARNm cible (Kertesz et al. 2007).

## 2. Inhibition de l'expression génique par les microARNs

Les microARNs inhibent l'expression des gènes soit par sa dégradation soit par inhibition de la traduction de l'ARNm cible. Le degré de complémentarité ainsi que la protéine argonaute impliquée dans le complexe RISC va déterminer le mécanisme mis en œuvre.

### a. Clivage et dégradation de l'ARNm

Dans le cas d'un appariement parfait entre le microARN et son ARNm cible, ce dernier est clivé au centre de l'hybridation microARN-ARNm, entre les nucléotides 10 et 11. Chez les mammifères, ce clivage est effectué par la protéine

Argonaute 2 qui est la seule à présenter cette activité endonucléase. Cependant, ce mode d'action, bien plus commun chez les plantes, reste relativement rare chez les animaux pour lesquels les appariements sont majoritairement imparfaits.

A la suite du clivage, l'ARNm cible est coupé en deux fragments, un constitué de l'extrémité 5'-phosphate et l'autre de l'extrémité 3'-hydroxyl, qui sont ensuite dégradés (Ameres and Zamore 2013).

#### b. Inhibition de la traduction de l'ARNm

Généralement l'appariement entre le microARN et son ARNm cible est imparfait dans ce cas on observe alors une inhibition de la traduction du messager. Les mécanismes moléculaires responsables de ce blocage traductionnel ne sont pas totalement élucidés mais plusieurs hypothèses sont avancées.

##### i. *Voie dépendante de la déadénylation de l'ARNm cible*

La répression de la traduction de nombreux ARNm cibles est associée à la déstabilisation de leur structure.

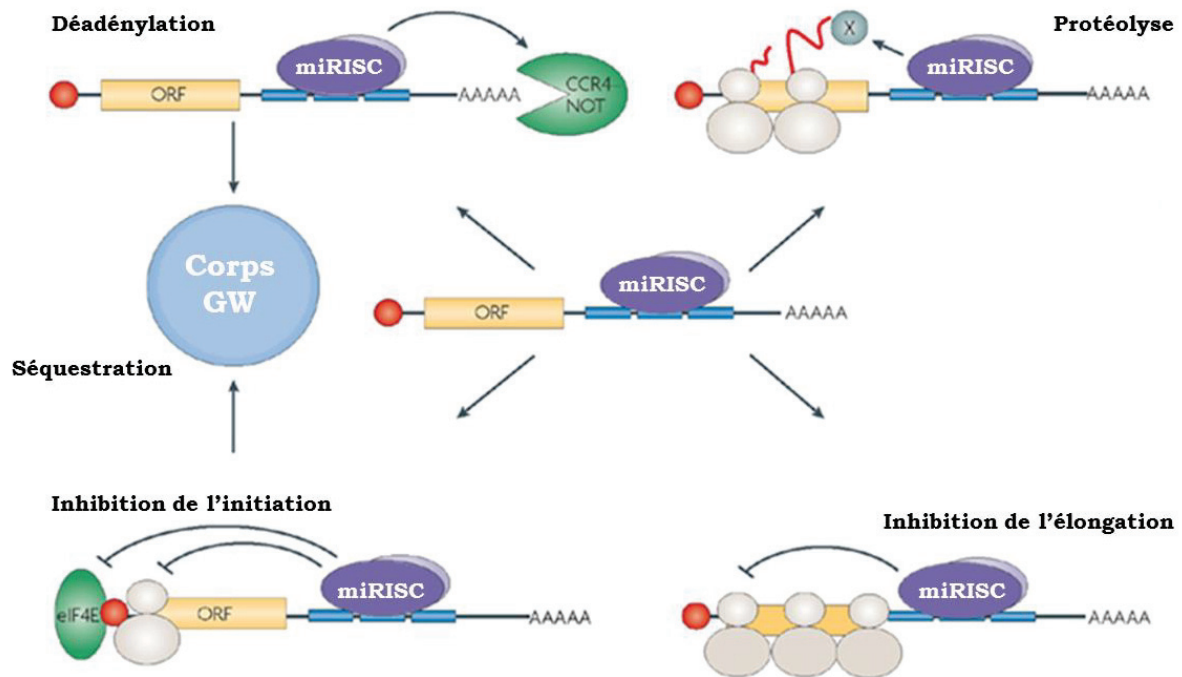
Dans un premier temps, le complexe ribonucléoprotéique RISC contenant le microARN, appelé miRISC, se fixe à l'ARNm cible. La protéine GW182, également contenu dans le miRISC, interagit avec Ago1 et recrute les complexes permettant un raccourcissement progressif de la queue poly-A, i.e. la déadénylation (Figure 17). Certains ARNm déadénylés s'accumulent dans le cytoplasme (Filipowicz et al. 2008). La déstabilisation de la structure de l'ARNm peut également entraîner sa dégradation, soit par catalyse par l'exonucléase XRN1 (5'-3' Exoribonuclease 1) dans le sens 5' vers 3' après suppression de la coiffe, soit par catalyse par un exosome dans le sens 3' vers 5'. La protéine Ago1 n'est pas indispensable à l'action de GW182 (Chekulaeva et al. 2009).

Enfin, la déadénylation médiée par le microARN étant un mécanisme indépendant de la traduction, et la répression de la traduction ne nécessitant pas toujours la déadénylation, certains ARNm sans queue poly-A peuvent être également réprimés par les microARNs.

##### ii. *Inhibition de l'initiation de la traduction*

L'inhibition de la traduction des ARNm par les microARNs peut également être réalisée au stade de l'initiation soit à l'étape de la reconnaissance de la coiffe soit au moment du recrutement de la sous-unité 60S du ribosome (Figure 17).

Les microARNs peuvent seulement inhiber la reconnaissance de la coiffe des ARNm possédant une coiffe m7G, qui est donc essentielle à la répression de la traduction par les microARNs (Humphreys et al. 2005).



**Figure 17. Mécanismes de régulation post-transcriptionnel des gènes par les microARNs chez les eucaryotes.** Le complexe ribonucléoprotéique RISC contenant le microARN, appelé miRISC, se fixe à l'ARNm cible induisant une inhibition de la traduction soit par déadénylation de la coiffe poly A, protéolyse du polypeptide naissant, inhibition de l'initiation ou de l'élongation. Les ARNm réprimés par déadénylation ou inhibition de l'initiation sont séquestrés dans des corps cytoplasmiques (GW) pour être dégradés ou stockés.

*D'après Filipowicz et al. (2008).*

### iii. Séquestration des ARNm dans des corps cytoplasmiques

La protéine GW182 peut également intervenir dans d'autres étapes de l'inhibition de la traduction des ARNm par les microARNs. Les miRISCs peuvent ainsi séquestrer les ARNm dans des corps cytoplasmiques appelés p-bodies (ARN processing bodies) ou corps GW (GW-bodies), grâce à une région particulière de la protéine GW182 (Figure 17). Les ARNm deviennent ainsi inaccessibles à la machinerie traductionnelle et sont alors stockés ou dégradés.

D'autres corps cytoplasmiques contiennent des ARNm, les granules de stress (stress granule SG) formés suite à une situation de stress ou une répression générale de l'initiation de la traduction. Ils peuvent ainsi, comme les p-bodies, jouer

un rôle dans l'inhibition de la traduction par les microARNs avec une accumulation des miRISCs à l'intérieur de ces granules (Filipowicz et al. 2008).

#### c. Inhibition après l'initiation

L'inhibition de la traduction des ARNm n'est pas limitée à celle de l'initiation. Certains ARNm, malgré une forte réduction de la production de leur protéine, sont tout de même associés à des polysomes. Les microARNs peuvent altérer le fonctionnement des ribosomes décélérant l'élongation ou terminant la traduction de façon prématurée (Maroney et al. 2006; Filipowicz et al. 2008) (Figure 17). Une autre hypothèse avance que les protéines peuvent être synthétisées puis dégradées par des protéases recrutées par le miRISC.

Les mécanismes de répression de la traduction des ARNm par les microARNs intervenant à différentes étapes de la traduction, il est suggéré que ces mécanismes puissent agir de concert.

#### d. Augmentation de l'expression génique par les microARNs

Plusieurs études ont mis en évidence que, sous certaines conditions, les microARNs pouvaient activer l'expression de leurs cibles plutôt que de la réprimer. Les microARNs peuvent notamment favoriser la traduction, la transcription ou encore la stabilité des ARNm cibles.

Une étude a montré que les microARNs miR-369-3p et miR-206 inhibaient la traduction de leur cible, TNF $\alpha$  et KLF4, dans des cellules en prolifération, mais les régulaient positivement dans des cellules quiescentes (Vasudevan et al. 2007). Ce changement de fonction s'expliquerait par l'association d'Ago2 avec des protéines différentes selon le contexte cellulaire, les miRISC inhibiteurs ne contenant pas de protéine FXR1 (Fragile X related protein 1).

Dans une autre étude, Orom et al. (2008) ont montré que miR-10a était capable de se lier à des ARNm cibles sans respecter les règles classiques d'appariement de la tête, et stimulerait ainsi la traduction des ARNm.

Les microARNs ont également la possibilité de favoriser la transcription des ARNm. Arzumanyan et al. (2012) ont notamment montré que miR-373 était capable de se lier à la séquence promotrice de son gène cible, la Cadhérine E, et d'augmenter son activité transcriptionnelle dans des cellules cancéreuses de prostate.

Un microARN peut également améliorer la stabilité d'un ARNm et empêcher sa dégradation. Ma et al. (2010) ont montré que miR-4661 peut améliorer la

stabilité de son ARNm cible, IL-10 et favoriser son expression au niveau nucléaire et protéique dans des macrophages. Pour cela, miR-4661 rentre en compétition avec les facteurs de dégradation RBP en se liant dans la région 3' non codante enrichie en éléments AU.

#### E. Fonctions biologiques des microARNs

Depuis que les microARNs ont été découverts, leur implication dans presque tous les processus biologiques majeurs, notamment le développement, le contrôle du cycle cellulaire, le système immunitaire ou le métabolisme, a été démontrée. Le rôle de ces microARNs étant essentiel au bon fonctionnement cellulaire, il n'est pas étonnant que leur dérégulation soit associée avec des états pathologiques au niveau de l'organisme.

##### 1. *Altérations génétiques*

L'implication des microARNs dans le développement d'un état pathologique peut reposer sur des altérations génétiques, au niveau du microARN ou de son gène cible.

L'altération de la régulation de l'expression des microARNs peut ainsi résulter d'une modification du gène codant pour le microARN, du pri-miARN, du pre-miARN ou du microARN mature. Ces modifications peuvent entraîner une perte de fonction des microARNs et ainsi augmenter l'expression de cibles initialement réprimées, ou à l'inverse induire une surexpression des microARNs qui répriment alors de façon excessive certains gènes.

Par ailleurs, une mutation sur le gène cible peut empêcher qu'il soit reconnu par son microARN régulateur ou à l'inverse créer un site illégitime de fixation d'un microARN et alors être réprimé.

L'action convergente de plusieurs microARNs dérégulés sur des protéines impliquées dans la même fonction biologique peut ainsi conduire à son altération.

La première implication d'un microARN dans un état pathologique a été découverte en 2002, avec l'identification d'une délétion dans le cluster miR-15a/miR-16 impliquée dans le développement de la leucémie lymphoïde chronique (Calin et al. 2002).

## 2. *microARNs tissulaires et pathologies*

Plusieurs études ont examiné les liens entre microARNs et pathologies, notamment en oncologie où le niveau d'expression de certains microARNs permet de distinguer un tissu normal d'un tissu cancéreux (He et al. 2015). Il a été notamment montré que certains microARNs sont pro-oncogènes, *i.e.* favorisent les cancers, et sont appelés les oncomiRs, et d'autres sont des suppresseurs de tumeurs, *i.e.* répriment les cancers, et appelés tsmiRs (Lee and Dutta 2009).

Le cerveau semble être le tissu présentant la plus grande richesse de microARNs exprimés, dont certains sont spécifiques au cerveau n'étant exprimés que dans celui-ci. De nombreuses études ont montré grâce à des animaux KO pour le gène de Dicer dans le système nerveux, que les microARNs jouent un rôle majeur dans le contrôle de la prolifération et la migration neuronale, dans le développement et la fonction du cerveau (Adlakha and Saini 2014). Au cours de l'embryogénèse, une inactivation de Dicer dans le cortex ou l'hippocampe, altérant ainsi la biosynthèse des microARNs, entraîne des malformations cérébrales, telle que la microcéphalie, et la mort peu après la naissance (Davis et al. 2008).

Plusieurs études ont montré que les microARNs tenaient également un rôle majeur dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires, notamment l'hypertrophie ventriculaire gauche, les cardiopathies ischémiques, l'arrêt cardiaque, l'hypertension et les arythmies (Romaine et al. 2015).

L'altération de l'expression des microARNs est également associée avec de nombreuses pathologies musculaires (Liu and Bassel-Duby 2015). Des analyses de puces à microARNs ont ainsi montré que 185 microARNs étaient exprimés de façon différente dans 10 pathologies musculaires majeures, comme les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker ou la myopathie à némaline, l'expression de miR-146b, miR-221, miR-155, miR-214 et miR-222 dans le muscle étant altérée dans chacune de ces pathologies (Eisenberg et al. 2007).

Enfin, l'implication des microARNs dans le contrôle de l'homéostasie glucidique et lipidique a également été montrée, les niveaux d'expression de certains microARNs étant altérés dans des modèles d'obésité et diabète de type 2 (Arner et al. 2012).

## 3. *Biomarqueurs circulants de pathologies*

De nombreuses études ont montré la présence des microARNs dans les fluides corporels (sérum, plasma, salive...), enfermés dans des vésicules (exosomes,

microparticules ou corps apoptotiques) ou associés soit à des lipoprotéines de haute densité (HDL) soit à des protéines liant l'ARN.

Il a été suggéré, que les niveaux d'expression des microARNs dans la circulation peuvent refléter les altérations d'expression des microARNs dans les tissus. De ce fait, ils peuvent être associés à certaines pathologies et servir ainsi de biomarqueurs, c'est notamment le cas dans beaucoup de cancers (Kanaan et al. 2012), ainsi que dans les infarctus du myocarde aigu ou l'arrêt cardiaque (Romaine et al. 2015), et dans le diabète (Prabu et al. 2015).

#### F. MicroARNs et activité/inactivité physique

Divers stimuli de l'environnement, physique ou comportementaux, peuvent induire un changement de l'expression des gènes. Comme on l'a exposé dans le chapitre I, la pratique régulière d'activité physique est responsable d'effets bénéfiques sur la santé. Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents de l'activité physique et sa façon d'influencer le phénotype sont encore mal connus. Comme on a pu le voir dans ce chapitre, les microARNs participent à la régulation de l'expression de nombreux gènes. Il est donc tout à fait vraisemblable que les microARNs soient impliqués dans les effets bénéfiques de l'activité physique. Parmi tous les microARNs décrits, seulement quelques-uns sont modifiés par l'exercice. La réponse des microARNs à l'exercice peut être différente selon le type de tissu ou la pratique de l'activité physique (Baggish et al. 2011; Pasiakos and McClung 2013; Xu et al. 2015).

##### 1. *Exercice et système nerveux central*

Du au caractère invasif des prélèvements du tissu cérébral ou neuronal, les études examinant l'effet de l'exercice sur les microARNs dans le système nerveux, sont réalisées sur des modèles murins.

L'exercice aérobie régule de façon positive les facteurs permettant le développement et la croissance des neurones, et est impliquée dans la rééducation du système nerveux central (Cotman and Berchtold 2002). L'expression des microARNs dans le tissu cérébral en réponse à l'exercice aérobie peut dépendre de l'intensité de l'effort. Dans une étude réalisée chez des rats, Mojtahedi et al. (2012) ont montré que miR-124, un microARN spécifique du cerveau, était plus exprimé dans l'hippocampe des rats faisant de l'exercice et que le niveau d'expression augmentait avec l'intensité de l'effort.



De plus, une étude a montré que les microARNs étaient impliqués dans la rééducation des lésions de la moelle épinière en réponse à l'exercice. Liu et al. (2012) ont examiné des rats ayant subi une lésion de la moelle épinière suivi d'une thérapie physique de 5 jours recommandée pour améliorer la plasticité de la moelle épinière. Ils ont montré que l'inflammation et l'apoptose causées par la lésion étaient atténuées par l'exercice et que l'expression de certains microARNs était associée à ces changements. Les souris ayant suivi la rééducation physique ont augmenté l'expression de miR-21 et diminué l'expression de miR-199a-3p, dans la moelle épinière, et modifié l'expression de leur gènes cibles, avec respectivement une diminution de PTEN et une augmentation de mTOR, au niveau ARN et protéines. D'autre part, le niveau d'exercice avant lésion peut être essentiel dans la prévention de l'apoptose associée à une lésion de la moelle épinière, via l'activation des voies de signalisation PTEN/mTOR (Liu et al. 2012).

Miao et al. (2015) ont également mis en évidence l'importance des microARNs comme médiateurs des effets protecteurs de l'exercice volontaire avant lésion cérébrale traumatique. Dans cette étude, les souris faisant de l'exercice volontaire, avant lésion, ont diminué leur risque de mortalité et amélioré leur récupération, et ont augmenté l'expression de miR-21, miR-92a, miR-874 et diminué l'expression de miR-138, let-7c et miR-124, dans le cortex cérébral. Ces microARNs semblent ainsi impliqués dans la prévention et la protection associée à l'activité physique en réponse à un traumatisme cérébral.

Ces études montrent de fait l'importance des microARNs dans le développement cérébral et neuronal en réponse à l'exercice.

## 2. *Le système cardiovasculaire*

La pratique régulière d'activité physique aérobie permet le développement non pathologique d'une hypertrophie du ventricule droit, associé à une meilleure capacité contractile du cœur et une amélioration de plusieurs paramètres cardiaques comme l'efficacité cardiopulmonaire et la performance physique (Fernandes et al. 2011b). Plusieurs études ont montré que l'exercice aérobie diminuait l'expression de certains microARNs dans le ventricule gauche, comme miR-1, miR-133a et miR-133b, et augmentait l'expression d'autres microARNs, miR-29a et miR-29c, avec en parallèle le développement d'une hypertrophie cardiaque chez des rats (Fernandes et al. 2011a; Soci et al. 2011). Une autre étude menée chez des rats ayant suivi un entraînement chronique de nage a montré l'implication de miR-21, miR-124, miR-144 et miR-145, des microARNs impliqués

dans la voie PIK3/Akt/mTor, dans le développement de l'hypertrophie cardiaque non pathologique (Ma et al. 2013).

De plus, l'entraînement physique aérobie promeut l'angiogenèse, un mécanisme pouvant également impliquer les microARNs. Fernandes et al. (2012) ont examiné les effets de la course sur tapis dans un modèle d'étude de l'hypertension, des rats SHR. L'entraînement permet de rétablir des niveaux d'expression normaux des microARNs miR-16, miR-21 et miR-126 dans le muscle cardiaque, d'augmenter les marqueurs de la vascularisation et de diminuer la pression sanguine. Il a notamment été montré que miR-126 est essentiel dans le maintien de l'intégrité endothéliale (Fish et al. 2008). De plus, l'augmentation de miR-126 induit par l'exercice aérobie améliore l'angiogenèse via l'activation des voies de signalisation MAPK et PI3K (Da Silva et al. 2012).

La régulation de miR-21 semble ainsi être impliquée dans les mécanismes sous-jacents des effets bénéfiques de l'exercice notamment au niveau cardiovasculaire (hypertrophie cardiaque et angiogenèse).

### 3. *Le muscle squelettique*

Comme pour les autres tissus, les microARNs sont impliqués dans de nombreux processus biologiques dans le muscle squelettique. Les niveaux d'expression très élevés de certains microARNs dans le muscle montrent qu'ils semblent spécifiques de ce tissu et sont ainsi appelés myomiRs, notamment miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208, miR-208b, miR-486 et miR-499 (Zacharewicz et al. 2013). La régulation transcriptionnelle des myomiRs est sous le contrôle de facteurs de régulation myogéniques, tels que MyoD, myogénine, Myf5 et MRF4 qui contrôlent également la régénération du muscle squelettique (Rao et al. 2006).

L'exercice joue un rôle important dans le maintien d'une fonction musculaire normale. Les effets de l'exercice sur l'expression des microARNs et leurs implications dans ces effets bénéfiques peuvent différer selon le type d'exercice.

#### a. Exercice de résistance

L'exercice de résistance pratiqué en aigu active les facteurs de transcription des myocytes et de l'expression de gènes anaboliques, augmentant la synthèse protéique (Phillips et al. 2012).

Plusieurs études ont montré l'implication des microARNs dans les mécanismes anaboliques du muscle, comme miR-1, miR-26a, miR-29a, miR-133a, miR-378 et miR-451. Une étude menée chez l'homme montre, que l'expression de miR-1 est diminuée 3h et 6h après un seul exercice de résistance, mais ne provoque aucun changement des niveaux d'expression de miR-133a et miR-206 (Drummond et al. 2008).

Daividsen et al. (2011) ont examiné les niveaux d'expression de 21 microARNs abondamment exprimés dans le muscle squelettique en réponse à un programme de 12 semaines d'exercices de résistance conçu pour induire une hypertrophie musculaire. Ils ont observé une différence de régulation de ces microARNs entre les sujets développant une hypertrophie et ceux ne développant pas ou peu d'hypertrophie. L'entraînement a augmenté les niveaux d'expression de miR-451 et diminuer ceux de miR-26a, miR-29a et miR-378 dans le muscle *Vastus lateralis* des sujets ne développant pas ou peu d'hypertrophie, ces sujets étant considérés comme présentant une résistance anabolique (Terzis et al. 2008).

Par ailleurs, McCarthy and Esser (2007) ont examiné les niveaux d'expression des microARNs dans les muscles *soleus* et *plantaris* de souris soumises à un protocole de surcharge fonctionnelle pendant 7 jours. Les muscles de ces souris présentaient une augmentation de l'expression du pri-miR-1-2, du pri-miR133a-2 et du pri-miR-206 et une augmentation de l'activité des protéines Drosha et Exportin-5, mais pas Dicer. Ils ont également observé une hypertrophie du muscle *plantaris*, dont la masse était augmentée de 45% (McCarthy and Esser 2007). Ces résultats montrent ainsi que ces microARNs sont associés à l'hypertrophie du muscle squelettique. De façon intéressante, cette étude montre également les effets de l'exercice sur l'activité des protéines impliquées dans la biosynthèse des microARNs.

A l'inverse des modèles d'exercice en résistance, les effets d'une immobilisation du muscle peuvent également permettre de comprendre le rôle des microARNs dans le mécanisme de régulation de la masse musculaire en examinant notamment la diminution de masse musculaire.

Chez des rats, l'immobilisation secondaire induite par une lacération du muscle *tibialis anterior* est associée avec une diminution de l'expression de miR-1, miR-133a et miR-206 seulement 1 jour après immobilisation (Nakasa et al. 2010).

Dans une étude menée sur des souris soumis à 11 jours de vols en apesanteur, l'expression de nombreux microARNs a été altérée dans le muscle

*gastrocnemius*, avec notamment une diminution de l'expression de miR-206 (Allen et al. 2009). Les auteurs ont également mis en évidence la diminution d'un certain nombre de facteurs de régulation impliqués dans l'atrophie musculaire, comme FoxO1, atrogin-1 et myostatin, mais le rôle de miR-206 dans la régulation des gènes musculaires n'est pas clairement établi. Il est intéressant de noter, que les microARNs étaient régulés de la même façon dans un protocole de suspension des pattes arrières (Allen et al. 2009).

Ringholm et al. (2011) ont montré qu'un protocole d'alitement de 7 jours chez l'homme était suffisant pour altérer les capacités métaboliques du muscle et induire une diminution de l'expression de miR-1 dans le muscle squelettique.

#### b. Exercice d'endurance

De nombreuses données montrent que l'exercice aérobie module également l'expression de nombreux microARNs, impliqués dans de nombreuses voies de signalisation du muscle, notamment la régulation de la transcription, le métabolisme, le développement musculaire et d'autres processus cellulaires (Keller et al. 2011).

Plusieurs études ont montré que certains microARNs étaient capables de réguler PPARGC1 $\alpha$ , un régulateur positif de nombreux de gènes impliqués dans l'angiogenèse, la biogénèse et l'activité des mitochondries, le métabolisme du glucose et des lipides. Safdar et al. (2009) ont notamment montré chez des souris soumises à un exercice aérobie prolongé une diminution de l'expression de miR-23 et une augmentation de l'expression de sa cible, PPARGC1 $\alpha$ . De la même façon, un autre microARN régulant ce gène, miR-696 était diminué dans le muscle squelettique de souris après 4 semaines d'entraînement progressif d'exercice aérobie et augmenté dans un protocole d'immobilisation unilatéral des pattes arrières (Aoi et al. 2010). Dans ce protocole, ils ont également montré que PDK4 et COXII, impliqués en aval dans la voie de signalisation de PPARGC1 $\alpha$  étaient également ciblés par miR-696, contribuant ainsi à l'augmentation de l'oxydation des acides gras et de la biogénèse mitochondriale chez les souris entraînées (Aoi et al. 2010).

Nielsen et al. (2010) ont examiné l'expression de certains microARNs dans le muscle squelettique de sujets masculins suite à un entraînement aérobie de deux semaines, suivis ensuite de deux semaines de désentraînement, *i.e.* aucune activité

structurée. L'expression de miR-1, miR-133a, miR-133b et miR-206 sont diminués suite à l'entraînement, puis après désentraînement sont restaurés à leur taux avant intervention. En parallèle, les auteurs ont observés une amélioration de la  $VO_{2max}$  et de la composition corporelle des sujets, avec l'entraînement.

Dans une autre étude, les niveaux d'expression de facteurs impliqués dans la biosynthèse des microARNs, et les niveaux d'expression de myomiRs et de microARNs dérégulés dans les myopathies, ont été examinés dans le muscle squelettique dans un protocole d'entraînement aérobie de 10 jours. Les effets de l'exercice en aigu et en chronique ont été évalués à partir des mesures faites avant intervention, 3h après la réalisation d'un exercice et après les 10 jours d'intervention (Russell et al. 2013). Les niveaux d'expression de Drosha, Dicer et de l'Exportin-5, ainsi que de miR-1, miR-133a, miR-133b et miR-181a étaient augmentés dans les 3 heures qui ont suivi un exercice aérobie, et à l'inverse miR-9, miR-23a, miR-23b et miR-31 étaient diminués. Suite aux 10 jours d'entraînement, ils ont observés que miR-1 et miR-29b sont augmentés et miR-31 diminués. En parallèle, ils ont montré une corrélation inverse entre miR-9, miR-31 et la protéine HDAC4, qui est un composant de la voie de signalisation MAPK, et entre miR-31 et NRF1 qui est impliqué dans la biogénèse et le métabolisme mitochondrial (Russell et al. 2013).

### c. Les microARNs circulants

Les microARNs étant exprimés et sécrétés par de nombreux tissus, notamment le tissu musculaire, et impliqués dans de nombreux mécanismes sous-jacents à l'exercice, il a été proposé de les utiliser comme marqueurs de la performance physique et de la capacité aérobie.

Plusieurs études ont montré un lien entre la capacité cardiorespiratoire  $VO_{2max}$  et les microARNs circulants. Les concentrations plasmatiques de miR-146a et miR-20a sont associées avec la  $VO_{2max}$  et la capacité à faire de l'exercice (Baggish et al. 2011). De façon similaire, dans une étude observationnelle, les concentrations de miR-21 et miR-210 dans le sérum sont inversement corrélés avec la  $VO_{2max}$ , avec ainsi une augmentation de leurs expressions chez les individus présentant une faible  $VO_{2max}$  (Bye et al. 2013). Dans cette étude, il a été également montré que l'expression de miR-210 seul ou en tenant compte de l'expression de miR-21, expliquait respectivement 12 et 15% de la variation de  $VO_{2max}$  chez 100 individus. Dans une autre étude, examinant les effets d'une seule session de vélo ou d'un entraînement de 4 semaines de vélo, ils ont montré que les concentrations de miR-

486 dans le sérum sont diminuées, et que ces changements sont négativement corrélés avec la  $VO_{2max}$  (Aoi et al. 2013).

Les microARNs servant également de biomarqueurs dans les cas de pathologies, comme le cancer (Kanaan et al. 2012), ils peuvent être utilisés pour comprendre comment l'exercice peut moduler des microARNs biomarqueurs de pathologies. Uhlemann et al. (2014) ont examiné les effets de différents types d'exercice sur les niveaux circulants de miR-126 et miR-133. Ils ont montré que les concentrations plasmatiques de miR-126 étaient augmentées après un test d'effort maximal sur cyclo-ergomètre à  $VO_{2max}$  et 4h après, et que celles de miR-133 étaient augmentées après un entraînement physique de résistance (Uhlemann et al. 2014). De plus, les niveaux circulants de ces deux microARNs ont également été augmentés après un marathon. Les auteurs suggèrent que miR-126 et miR-133 sont de bons candidats en tant que biomarqueurs des effets négatifs causés par l'exercice pratiqué en aigu, car semblent respectivement impliqués dans les altérations endothéliales et musculaires induites par l'exercice (Uhlemann et al. 2014).

Par ailleurs, l'exercice de résistance augmente en aigu le niveau plasmatique de miR-149-3p et diminue les niveaux d'expression de miR-146a et miR-221 dans le plasma 3 jours après l'exercice. Les concentrations plasmatiques de ces microARNs étaient corrélées avec les concentrations circulantes de l'hormone de croissance IGF-1 (insulin-like growth factor-1) et de la testostérone (Sawada et al. 2013). A l'inverse, les niveaux circulants de miR-146a et miR-221 étaient diminués après un exercice de type aérobie dans le plasma (Baggish et al. 2011).

Les microARNs miR-1, miR-133a, miR-206, miR-499, miR-208a et miR-208b sont enrichis dans les muscles cardiaque et squelettique par rapport aux autres organes (Aoi et al. 2010). Les niveaux d'expression de ces microARNs dans la circulation étant assez faibles chez des individus en bonne santé, Xu et al. (2015) ont fait l'hypothèse qu'une augmentation de leur expression dans la circulation pourrait être un indicateur d'un infarctus du myocarde mais également lié à une activité physiologique élevée. Mooren et al. (2014) ont notamment montré que chez des sportifs endurants de haut niveau, la course d'un marathon a augmenté les niveaux circulants de miR-1, miR-133a, miR-499 et miR-208a. Un jour après la course (24h), les niveaux d'expression de miR-499 et miR-208a sont redescendus à leur niveau basal (avant course), mais ceux des autres microARNs sont restés plus

élevés. L'origine possible de ces microARNs dans la circulation est l'altération du tissu musculaire lors de l'exercice.

D'autre part, des associations positives ont été identifiées entre certains microARNs spécifiques, corrélés avec la capacité cardiorespiratoire, et des facteurs de risques cardiovasculaires, tels que miR-21 et la protéine C-reactive, miR-210 et l'aspartate aminotransférase, miR-21 et un facteur de risque de diabète (Finish type 2 diabetes risk score) (Bye et al. 2013).

Une étude menée chez des skieurs de haut niveau (national), montre que lors d'un exercice aérobie de 30 minutes réalisé à 80% de la  $VO_{2max}$ , l'expression de miR-21-5p, miR-24-2-5p, miR-27a-5p et miR-181a-5p était augmentée dans les leucocytes (Tonevitsky et al. 2013). Afin d'identifier une ou plusieurs fonctions biologiques qui seraient associées de façon spécifique à ces microARNs, les auteurs ont réalisés une analyse d'enrichissement à partir de la liste des gènes cibles de ces microARNs. Ils ont montré un enrichissement de gènes impliqués dans les voies de signalisation du métabolisme, de la réponse immunitaire, de la régulation de la transcription et l'apoptose (Tonevitsky et al. 2013).

Ces études montrent que certains microARNs circulants sont associés avec la capacité cardiorespiratoire et modifiés avec les changements du niveau d'activité physique.

#### G. Questions en suspens

L'association entre les niveaux circulants de certains microARNs et certaines pathologies, comme les maladies cardiovasculaires ou les cancers, suggère que le suivi des niveaux circulants de ces microARNs peut apporter des informations sur l'évolution de ces pathologies. L'activité physique ayant des effets bénéfiques sur les maladies cardiovasculaires, ces microARNs pourraient servir de biomarqueurs circulants des effets de l'activité physique sur l'évolution de ces pathologies.

Comme décrit dans ce chapitre, les niveaux d'expression de certains microARNs, tissulaires ou circulants, sont modifiés par l'exercice et associés avec des paramètres liés à la capacité physique. Dès lors, les fonctions biologiques des microARNs dans les tissus, comme le muscle, ou dans le dialogue inter-organe nécessitent d'être mieux caractérisés. La compréhension de leur implication dans les processus biologiques permettra ainsi d'analyser plus finement leur rôle dans la régulation du phénotype en réponse à l'entraînement physique.

Enfin, les microARNs étant retrouvés dans la circulation, leurs niveaux d'expression circulants peuvent refléter l'état physiologique du corps, par exemple la condition physique liée à la pratique d'activité physique. Leur utilisation potentielle comme biomarqueurs circulants du niveau d'activité physique d'un individu peut ainsi être également examinée.





# OBJECTIFS ET APPROCHES

Il est aujourd'hui admis que la pratique d'une activité physique régulière est bénéfique pour la santé, alors que l'inactivité physique altère différentes fonctions métaboliques, au premier rang desquelles la sensibilité à l'insuline et la capacité à oxyder les lipides aux dépens de leur stockage. Si l'impact direct de l'inactivité physique sur le muscle a fait l'objet de nombreux travaux, ses effets sur le stockage ectopique de lipides – indépendamment des effets de l'activité physique sur la balance énergétique – sont moins bien caractérisés, notamment au niveau hépatique. D'un autre côté le rôle de différents acteurs du dialogue inter-organe dans les effets musculaires et systémiques de l'activité ou de l'inactivité physique, tels que l'adiponectine ou les microARNs, n'est pas encore totalement élucidé.

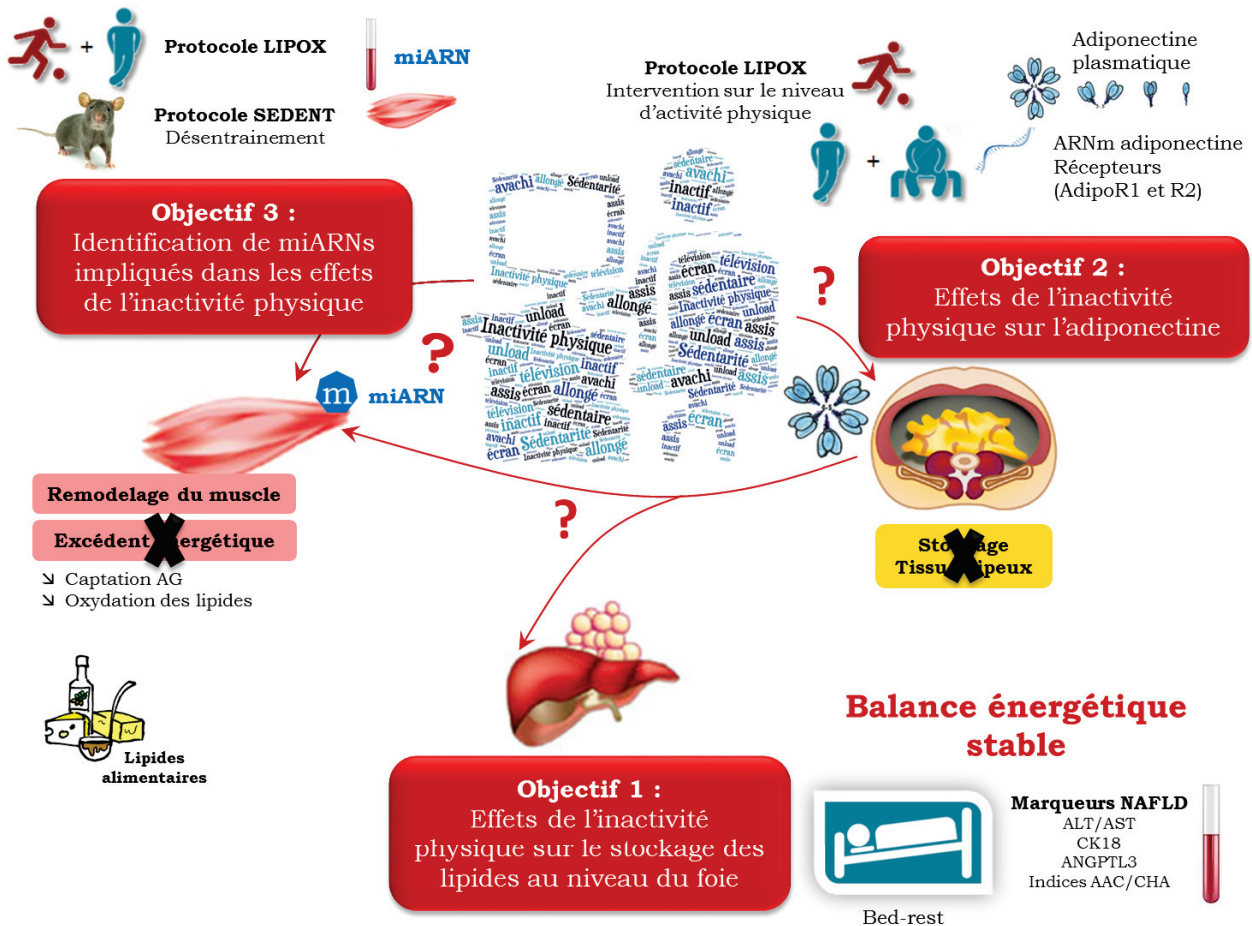
L'objectif général de mon travail de thèse concerne ainsi l'étude des effets de différents niveaux d'activité physique, activité modérée et inactivité modérée ou extrême, en conditions de balance énergétique stable, sur le métabolisme du foie mais également du muscle, et sur deux acteurs du dialogue inter-organe (cross-talk) : l'adiponectine et les microARNs (Figure 18).

L'hypothèse testée dans le premier chapitre est qu'une diminution de la capacité oxydative des lipides au niveau musculaire, induite par l'inactivité physique favorise un stockage ectopique des lipides au niveau hépatique et le développement d'une stéatohépatite. L'hypothèse corolaire est qu'un exercice combiné résistif et aérobique en contre-mesure prévient au moins partiellement l'augmentation des marqueurs hépatiques. De ce fait, les conséquences de 60 jours d'inactivité physique extrême (bed-rest) sur l'évolution de marqueurs de stéatohépatite non alcoolique (NAFLD pour non-alcoholic fatty liver disease), indépendamment de tout effet de l'inactivité sur la balance lipidique maintenue stable durant le protocole, ont été examinées (**Article I**). Au cours de cette étude d'alitement prolongé, le suivi de quatre marqueurs hépatiques de stéatose ou de formes plus ou moins sévères de stéato-hépatite a été réalisé : les aminotransférases alanine et aspartate, deux marqueurs de stéatose hépatique, la cytokératine 18, un marqueur d'apoptose hépatique et l'angiopoietin-like 3 dont l'augmentation est associée à des formes plus sévères de stéatohépatite non alcoolique ; ainsi que deux indices combinant différents marqueurs de NAFLD sans

ou avec un indice d'insulino-résistance. En parallèle, les effets d'un entraînement combinant exercice aérobie et en résistance, comme contre-mesure du protocole de bed-rest, ont été examinés.

Dans un seconde chapitre, j'aborde l'hypothèse selon laquelle l'activité physique induit, en l'absence de variation pondérale, non pas une augmentation mais une diminution des concentrations plasmatiques d'adiponectine (l'inverse étant alors attendu pour l'inactivité physique) associée à une amélioration de la sensibilité musculaire à l'adiponectine. La seconde étude se consacre ainsi aux effets de l'activité et inactivité physique per se sur la concentration plasmatique en adiponectine, indépendamment de toute variation de la composition corporelle (**Article II**). Pour cela, les taux circulants d'adiponectine ont été mesurés chez des sujets actifs et inactifs, avant et après intervention sur leurs niveaux d'activité physique, respectivement un désentraînement de 4 semaines et un entraînement de 8 semaines, et dont la balance énergétique a été maintenue stable (protocole LIPOX). La concentration des différentes formes circulantes d'adiponectine, et son expression dans le tissu adipeux et le muscle ont été évaluées avant et après intervention, de même que l'expression de ses récepteurs R1 et R2 et d'APPL1 dans le muscle. Les associations entre les changements d'adiponectine (circulation, récepteurs) et les changements de la capacité cardiorespiratoire des sujets comme marqueurs du niveau d'activité physique et avec l'insulinémie ont été testés.

Enfin la dernière partie s'appuie sur l'hypothèse que certains microARNs sont impliqués dans les mécanismes sous-jacents de l'activité physique, que ce soit au niveau du muscle ou dans d'autres tissus. Certains microARNs étant sécrétés dans la circulation, on peut également émettre l'hypothèse que les niveaux d'expression circulants de ces microARNs, associés aux fonctions biologiques de l'activité physique, peuvent servir de biomarqueurs circulants du niveau d'activité physique. L'identification de microARNs pouvant servir de biomarqueurs du niveau d'activité physique a été réalisée dans l'étude LIPOX, où les niveaux d'activité physique sont bien caractérisés et la balance énergétique a été maintenue stable (**Article III**). Parmi les microARNs associés à des paramètres biologiques liés au niveau d'activité physique, l'implication de miR-148b dans les effets musculaires de l'inactivité physique, et plus précisément dans la transition vers l'inactivité a été explorée dans un protocole de désentraînement chez la souris (SEDENT). Le rôle de miR-148b dans les effets biologiques de l'inactivité physique a ensuite été étudié plus en détail in vitro dans des cellules primaires musculaires différenciées humaines.



**Figure 18. Figure synoptique des principaux objectifs développés dans la thèse.** Articulation des 3 grands objectifs de mon travail de thèse en lien avec l'inactivité physique, les modèles d'études retenus et les mesures réalisées. AAC et CHA, Indices combinés de NAFLD ; AG, Acides Gras ; ALT, Alanine aminotransférase ; ANGPTL3, Angiotensin-like 3 ; AST, Aspartate aminotransférase ; CK18, Cytokératine 18 ; miARN, microARN ; NAFLD, Stéato-hépatite non alcoolique.



# MATERIELS ET METHODES

Pour une raison de clarté, j'ai choisi de présenter dans un premier temps les différents modèles, *in vivo* et *in vitro*, puis de détailler les méthodes d'exploration des échantillons obtenus *in vivo* et *in vitro*, notamment les mesures de l'adiponectine, des microARNs et d'autres marqueurs, et enfin de terminer par les analyses statistiques.

## A. Protocoles in vivo

### 1. *Protocoles cliniques*

Une grande partie de ce travail de thèse repose sur deux protocoles cliniques chez l'homme : le premier qui a permis de tester les effets d'une inactivité extrême sur les marqueurs hépatiques de NASH et NAFLD, le deuxième qui a permis d'étudier les conséquences de variations du niveau d'activité physique en conditions de vie libre dans l'intervalle des recommandations actuelles pour la population générale 1) sur les variations de l'adiponectine, et 2) sur les mirs.

#### a. Protocole d'inactivité physique sévère – bed-rest

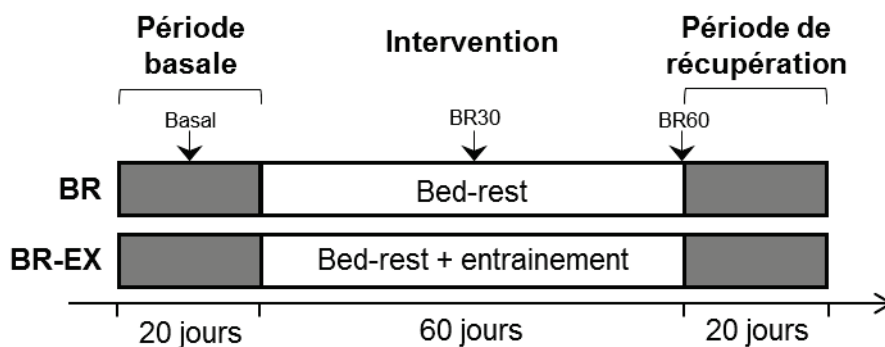
Les effets de 60 jours d'inactivité physique extrême sur l'évolution de marqueurs d'une stéato-hépatite non alcoolique indépendamment des variations de balance énergétique, ont été examinés au cours d'un protocole d'allongement prolongé de type bed-rest.

Le bed-rest est un protocole d'alitement prolongé, où les sujets sont dans une position allongée avec la tête en décline par rapport aux pieds selon un angle de  $-6^\circ$  par rapport au plan horizontal. Cette condition expérimentale permet de reproduire certains effets de la microgravité notamment sur le système cardiovasculaire et conduit à de nombreuses altérations physiologiques : diminution du volume plasmatique, de la masse et de la force musculaire, de la densité osseuse ou encore de la sensibilité à l'insuline (Bergouignan et al. 2011). Cette étude a été menée par Stéphane Blanc en tant que principal investigateur, supportée par les agences spatiales Européennes, Françaises, Américaines et Canadiennes et financée par le Centre National d'Etudes Spatiales, le Centre National de la Recherche Française, l'Université Louis Pasteur et l'Institut de Recherche en Santé du Canada.

#### i. *Population d'étude et intervention*

L'étude a été conduite chez 16 sujets de sexe féminin, normo-pondérées et en bonne santé, répartis en deux groupes de même effectif (n=8). Les deux groupes ont

été soumis à 60 jours de bed-rest (Bergouignan et al. 2009) : un groupe constitue le groupe contrôle et l'autre groupe est soumis, en parallèle du bed-rest, à une contre-mesure sous forme d'un entraînement combinant exercices aérobie et en résistance, pratiqué en position allongée (Figure 19). Les exercices de résistance ont été réalisés par session de 35 minutes tous les trois jours sur un ergomètre couché (flywheel) à effort maximal, et les exercices aérobies ont été réalisés 3 à 4 fois par semaine lors de sessions de 50 minutes à 40-80% de la capacité cardiorespiratoire maximale mesurée avant bed-rest.



**Figure 19. Déroulement du protocole d'alitement prolongé, bed-rest.** L'étude a été conduite chez 16 femmes normo-pondérées en bonne santé réparties en deux groupes : BR, Bed-rest (n=8) et BR-EX, Bed-rest combiné à de l'exercice (n=8). Les explorations biologiques ont été réalisées en basal, 30 jours après le début du bed-rest (BR30) et à la fin du bed-rest, soit à 60 jours (BR60).

*D'après Bergouignan et al. (2009)*

La prise alimentaire des sujets était étroitement contrôlée tout au long de l'étude afin de maintenir la balance énergétique. Aucune consommation d'alcool n'était autorisée.

La composition corporelle (poids corporel, masse grasse et masse maigre) des sujets a été mesurée par imagerie DXA (dual-energy X-ray absorptiometry) en basal, après 30 jours de bed-rest (BR30) et à la fin de l'alitement prolongé, soit à 60 jours de bed-rest (BR60).

## ii. Paramètres métaboliques et marqueurs hépatiques

Le devenir des lipides alimentaires a été examiné avant et à 30 jours de bed-rest et a fait l'objet d'une publication antérieure (Bergouignan et al. 2009). Dans notre travail nous avons mesuré l'insulinémie à jeun par radio-immunologie (DSL, Webster, USA), et la glycémie et les taux de triglycérides à jeun par des méthodes enzymatiques (Biomérieux, Lyon, France) sur des échantillons de plasma recueillis



en basal et à BR30, et stockés à -80°C. Du fait de l'insuffisance de plasma, les taux de triglycérides et l'insulinémie n'ont pas pu être mesurés à BR60.

De façon similaire, les marqueurs hépatiques ont été mesurés sur des échantillons de plasma stockés à -80°C en basal, à BR30 et BR60. L'alanine aminotransférase (ALT) et l'aspartate aminotransférase (AST) plasmatiques ont été mesurés par dosage enzymatique au phosphate de pyridoxal, comme utilisé en routine dans les laboratoires hospitaliers. Les concentrations plasmatiques d'angiopoïétin-like 3 (ANGPTL3), une protéine plasmatique produit par le foie qui module la clairance des triglycérides plasmatiques et dont la concentration est augmentée dans les formes sévères de NAFLD, et les fragments de cytokeratin 18 (CK18), un marqueur de l'apoptose hépatique et considérée comme un bon prédicteur de stéato-hépatite, ont été dosés avec des kits Elisa, respectivement Quantiline Human Angiopoïétin-like3 (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) et M30 Apoptosense (Peviva, Stockholm, Suède).

D'autre part deux indices combinés de ces différents marqueurs, associé pour l'un d'entre eux à un indice d'insulinorésistance ont également été calculés : l'indice AAC (acronyme pour AST, ALT et CK18) qui correspond à la somme des valeurs réduites (par rapport au valeurs en basal) de AST, ALT et CK18, et l'indice CHA (acronyme pour CK18, et des indices HOMA-IR et AST) calculé comme le produit de l'indice HOMA-IR (homeostasis model assessment – insulin resistance), AST et CK18, divisé par 1000 (Polyzos et al. 2013). Comme l'insulinémie n'a pu être mesurée à BR60, l'indice CHA n'a pu être calculé à BR60.

#### b. Protocole d'activité et d'inactivité physique modérée - LIPOX

Afin de définir le rôle de l'activité et de l'inactivité physique *per se*, indépendamment de la composition corporelle, sur les différentes formes d'adiponectine et d'étudier l'implication des microARNs dans les effets de l'activité/inactivité physique, les données de l'étude LIPOX ont été utilisées.

Cette étude réalisée chez l'homme, est une étude d'intervention visant initialement à étudier les effets *per se* d'une modification de l'activité physique (entraînement ou désentraînement) sur l'oxydation des lipides alimentaires chez des sujets de poids normal ou en surpoids, indépendamment des effets que peut avoir l'activité physique sur le poids (Bergouignan et al. 2013), grâce à un ajustement régulier de leur régime alimentaire.

Cette étude a été mise en place par Chantal Simon et Stéphane Blanc à l'Université de Strasbourg. Elle a été financée par l'Institut National de la Santé et

de la Recherche Médicale (INSERM) et l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) (PRNA-2006), par les fondations Cœur et Artères et Louis D. et par les Hôpitaux universitaires de Strasbourg.

i. *Population d'étude et critères d'inclusion*

L'étude a été conduite chez 36 sujets répartis en trois groupes de même effectif, selon leur niveau d'activité/inactivité et leur indice de masse corporelle.

Une première phase, par téléphone, a conduit à la présélection de sujets potentiels et la réalisation d'une visite à l'hôpital au cours de laquelle des mesures anthropométriques ont été réalisées, et le niveau d'activité/inactivité des sujets évalué.

Les principaux critères d'inclusion étaient un statut actif accompagné d'un indice de masse corporelle de  $20 \leq \text{IMC} \leq 25 \text{ kg/m}^2$  pour le groupe de sujets actifs normo-pondérés, et un statut inactif associé respectivement d'un IMC de  $20 \leq \text{IMC} \leq 25 \text{ kg/m}^2$  et de  $25 < \text{IMC} \leq 35 \text{ kg/m}^2$  respectivement pour les groupes de sujets inactifs normo-pondérés et en excès de poids (Tableau 1).

**Tableau 1. Critères d'inclusion et d'exclusion des sujets de l'étude LIPOX.**

	Actifs	Sédentaires	
	Normo-pondérés	Normo-pondérés	Surpoids
	NA	NS	OS
<b>Critères d'inclusion</b>			
Homme de 18 à 55 ans	✓	✓	✓
Consommation d'alcool < 40 g/j	✓	✓	✓
Affiliation à un régime de sécurité sociale	✓	✓	✓
Majeur libre (pas de régime de protection judiciaire)	✓	✓	✓
Obtention du consentement éclairé	✓	✓	✓
IMC $\leq 25 \text{ kg/m}^2$	✓	✓	
IMC $> 25 \text{ kg/m}^2$ et tour de taille $> 102 \text{ cm}$			✓
Niveau d'activité physique sédentaire		✓	✓
Niveau d'activité physique actif	✓		
Antécédents familiaux d'obésité			✓
<b>Critères d'exclusion</b>			
Prise médicamenteuse susceptible d'interférer avec le métabolisme énergétique, glucidique ou lipidique	✓	✓	✓
Dépendance tabagique	✓	✓	✓
Diabète ou hypertension artérielle ou autre pathologie évolutive associée	✓	✓	✓
Contre-indication à la pratique d'exercices physiques	✓	✓	✓
Voyage en dehors de la France 15 j avant l'inclusion	✓	✓	✓
Antécédents familiaux d'obésité (1er degré)	✓	✓	
Antécédents de néoplasie	✓	✓	
Modification de poids récente, volontaire ou non			✓

De plus, ces sujets, en bonne santé, ne souffrant pas de maladies chroniques, présentaient un poids stable ( $\pm 3\text{kg}$ ) sur les trois mois précédents leur inclusion. Les sujets normo-pondérés ne présentaient pas d'antécédents familiaux au premier degré d'obésité ou de diabète de type 2. En revanche, les individus en surpoids présentaient au moins un parent en surpoids.

Un consentement éclairé a été obtenu pour chaque sujet. L'étude a reçu l'approbation du Comité d'éthique d'Alsace (France).

ii. *Mesure du niveau d'activité/inactivité physique*

Les niveaux initiaux d'activité/inactivité physique ont été déterminés au moyen d'un questionnaire d'activité physique, le questionnaire MOSPA-Q (MONICA Optional Study of Physical Activity), d'un accéléromètre triaxial RT3 (Stayhealthy, Monrovia, CA, USA). Au cours de l'étude ces niveaux ont été à nouveau mesurés à l'aide d'un accéléromètre triaxial RT3 (Stayhealthy, Monrovia, CA, USA), d'un capteur enregistrant le rythme cardiaque et les mouvements du corps, l'Actiheart (Cambridge Neurotechnology Ltd) tous les deux portés sur une période de 7 jours en conditions de vie libre et par la méthode de référence à l'aide d'eau doublement marquée (EDM).

L'utilisation de l'accéléromètre triaxial RT3 a permis l'estimation pour chaque sujet de son niveau d'activité physique (NAP) initial, défini comme le ratio entre la dépense énergétique total DET et la dépense énergétique de repos DER.

La capacité cardiorespiratoire  $\text{VO}_{2\text{max}}$  a été déterminée au cours d'un test d'effort croissant jusqu'à épuisement, réalisé dans une position verticale sur un vélo ergomètre à résistance électronique (Medifit 1000S, Belgique).

La présence ou l'absence d'activité structurée pendant les douze mois précédant l'étude a été utilisée comme critère additionnel pour déterminer le niveau d'activité ou d'inactivité physique des sujets. Ainsi les sujets présentant un  $\text{NAP} \leq 1,5$  et ne présentant aucune activité structurée étaient considérés comme inactifs, et ceux présentant un  $\text{NAP} \geq 1,7$  et au moins une activité sportive régulière étaient considérés comme actifs.

La dépense énergétique totale DET a été estimée avant et après intervention sur une période de 10 jours, en conditions de vie libre, par la technique d'EDM.

Dans un premier temps, les sujets ont fourni un échantillon d'urine à jeun, permettant la mesure de l'enrichissement isotopique en basal (échantillon de référence). Les sujets ont ensuite ingéré, en une seule prise, à raison de  $2\text{g/kg}$  de

masse corporelle totale, de l'EDM composée de 0.2g/kg de H<sub>2</sub><sup>18</sup>O (enrichie à 99.85%, CIL, ANDOVER, MA) et de 0.15g/kg de <sup>2</sup>H<sub>2</sub><sup>18</sup>O (enrichie à 10%, CIL, ANDOVER, MA). Des prélèvements d'urine ont été réalisés 3h et 4h après la prise d'EDM, afin de déterminer l'espace de dilution isotopique, et les jours suivants (J3, J7 et J10). Le dosage des isotopes <sup>2</sup>H et <sup>18</sup>O dans ces échantillons a permis de mesurer la production de CO<sub>2</sub>, et d'en déduire la DET. La dépense énergétique liée à l'activité physique (AEE) a été calculée comme 90% de la DET (c'est-à-dire la DET moins la thermogénèse postprandiale estimée à 10% de la DET) minorée de la dépense énergétique de repos. Cette dernière a été mesurée par calorimétrie indirecte.

### iii. *Données anthropométriques et composition corporelle*

Afin de calculer l'indice de masse corporelle IMC des sujets, leur poids et taille ont été mesurés de façon standardisée. Selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les sujets présentant un IMC compris entre 27 et 35 kg/m<sup>2</sup> sont considérés en surpoids. Le tour de taille a également été mesuré comme marqueur de distribution de la graisse.

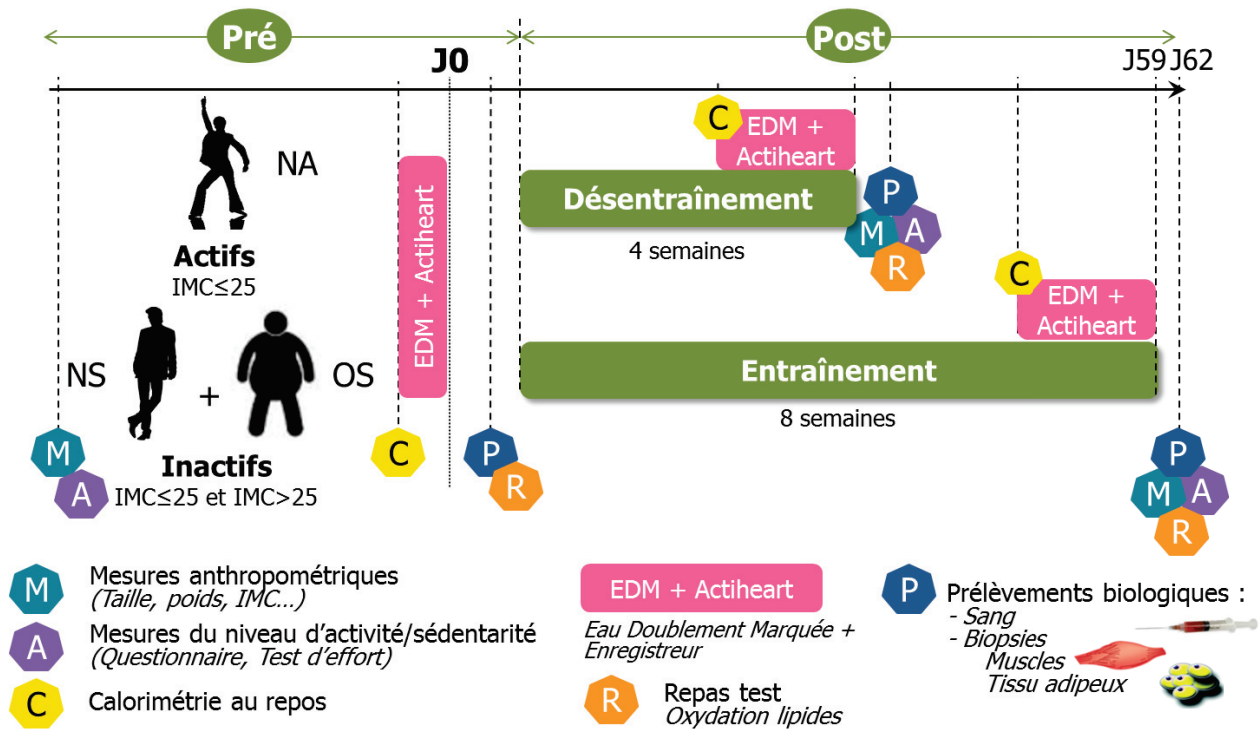
La composition corporelle des sujets a été mesurée par hydrométrie, à partir de l'eau corporelle totale estimée lors de la mesure de la DET par la technique d'EDM. La masse maigre a été calculée à partir de l'eau corporelle totale, considérant un facteur d'hydratation de 73.2%. La masse grasse a été calculée comme la différence entre le poids corporel du sujet et de sa masse maigre.

### iv. *Intervention*

Il a été demandé aux sujets actifs de réaliser un désentraînement physique sur une période de quatre semaines (Figure 20), consistant en l'arrêt total de toutes activités physiques structurées et la diminution des activités spontanées quotidiennes.

L'entraînement physique des sujets inactifs a été réalisé sur la base des recommandations de santé de l'OMS (l'équivalent de 150 min d'exercice d'intensité modéré par semaine), adaptées en 4 séances par semaine, sur une période de huit semaines. En d'autres termes, les sujets ont suivi un programme hebdomadaire de 3 séances de 60 minutes à 50% de leur consommation maximale d'oxygène VO<sub>2max</sub> (L/min), sur un cycloergomètre ; de plus, il leur a été demandé de faire une séance supplémentaire équivalente sous forme de marche ou de vélo le week-end.

Afin d'obtenir les effets d'une modification de l'activité physique *per se* indépendamment des effets que peut avoir l'exercice sur le poids, la balance énergétique des sujets a été maintenue stable au cours de l'étude. Pour cela, des diététiciens ont suivi les sujets tout au long de l'étude afin d'ajuster régulièrement leur régime alimentaire de telle sorte qu'ils maintiennent un poids stable.



**Figure 20. Déroulement de l'étude LIPOX.** L'étude a été conduite chez 36 hommes en bonne santé répartis en trois groupes de même effectif : actifs normo-pondérés, inactifs normo-pondérés et inactifs en surpoids. Les sujets actifs ont été désentraînés sur 4 semaines et les sujets inactifs ont été entraînés sur 8 semaines. Les explorations ont été réalisées avant et après modulation du niveau d'activité.

*D'après Bergouignan et al. (2013)*

#### v. Prélèvements biologiques

Une série de prélèvements biologiques et de tests similaires a été réalisée chez les sujets, avant et après intervention (Figure 20).

Lors de deux journées test, identiques, avant et après l'intervention sur l'activité physique, des prélèvements de sang et d'urine ont été effectués toutes les heures, sur une période de 9 heures. Des microbiopsies musculaires et de tissu adipeux ont été réalisées sous anesthésie locale (Lidocaïne 2%), 8 heures après la prise d'un petit-déjeuner et d'un déjeuner standards. Les biopsies de muscle ont été effectuées dans le muscle *Vastus lateralis* de la cuisse en utilisant une aiguille modifiée de Bergström. Les biopsies de tissu adipeux ont été réalisées dans la

région péri-ombilicale, par l'utilisation d'une aiguille permettant le prélèvement de 100 à 200mg.

vi. *Paramètres métaboliques plasmatiques et tissulaires*

*Paramètres métaboliques d'intérêt*

La glycémie et l'insuline ont été mesurés à jeun respectivement par réaction chimique à l'aide du kit Synchron GLUCm glucose, et par test immunologique à partir du kit Siesmens ADVIA Centaur Insulin Iri.

*Mesures de l'adiponectine*

L'adiponectine totale et les différentes formes d'adiponectine circulantes ont été mesurées dans le plasma par 3 kits ELISA différents sur des échantillons de plasma prélevés à jeun et stockés à -80°C.

Le premier kit, le kit Millipore, permet de mesurer l'adiponectine HMW. Le second, le kit R&D, permet de mesurer l'adiponectine totale. Le kit Bühlmann, enfin, permet de quantifier les formes plasmatiques de l'adiponectine HMW, MMW et LMW, leur somme donnant l'adiponectine totale. Les caractéristiques de ces 3 kits sont présentées dans le Tableau 2.

**Tableau 2. Caractéristiques des kits ELISA de mesure de l'adiponectine utilisés dans l'étude LIPOX selon les procédures des fournisseurs.**

<b>Fournisseur (Référence kit)</b>	<b>Adiponectine</b>	<b>Limite de détection</b>	<b>Domaine de mesure</b>	<b>CV intra-essai</b>	<b>CV inter-essai</b>
Millipore (EZHMWA-64K)	HMW	0,5 ng/mL	1,56 - 200 ng/mL	2,40%	5,50%
R&D Systems (DRP300)	Totale	0,246 ng/mL	NC	3,50%	6,50%
Bühlmann (EK-MADP)	HMW	NC	0,08 - 4,8 ng/mL	4,20%	5,70%
	MMW	NC	0,08 - 4,8 ng/mL	12%	NC
	LMW	NC	0,08 - 4,8 ng/mL	10,20%	NC
	Totale	NC	0,08 - 4,8 ng/mL	5,40%	5%

L'expression génique de l'adiponectine a été mesurée dans le tissu adipeux et le muscle, et celle de ses récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 dans le muscle a été mesurée par RT- qPCR, technique expliquée dans la partie E.1 de ce chapitre Matériels et Méthodes.

c. *Autres protocoles cliniques*

Au cours de ma thèse, j'ai également eu accès à des échantillons de muscle squelettique et de sérums provenant de différents protocoles réalisés dans d'autres laboratoires réalisant des collaborations avec notre unité de recherche :

- Des sérums recueillis par le Dr Nancy Rherer (Université d'Otago ; Nouvelle-Zélande) chez des sujets actifs (vélo), et des sujets non actifs qui ont été recrutés dans un protocole d'entraînement où il leur était demandé d'effectuer leur déplacement quotidien en vélo. Les mesures de la capacité cardiorespiratoire maximale et le prélèvement des échantillons ont été réalisés avant et après modification du mode de vie pendant environ 15 semaines et stockés -80°C.

- Des sérums recueillis par le Dr Christian Denis (Université de St Etienne) chez des sujets non actifs en surpoids ou obèses recrutés dans un protocole d'entraînement combinant exercices aérobic et de résistance. La moitié des sujets constituait un groupe témoin, sans intervention sur le niveau d'activité physique, et l'autre moitié des sujets suivait un entraînement de 14 semaines constitué de 3 séances par semaine d'une heure et demie combinant un travail d'endurance sur cycloergomètre et de résistance musculaire. Les échantillons ont été prélevés avant et après intervention et stockés à -80°C.

Nous disposons également au laboratoire d'une banque de cellules humaines conservées dans l'azote liquide (DIOMEDE), en collaboration avec le Dr Maud Robert (Service de chirurgie digestive ; Hospices Civils de Lyon) et le Pr Michel Fessy (Service de Chirurgie orthopédique et traumatologie ; Hospices Civils de Lyon) grâce à laquelle j'ai pu avoir accès à des biopsies (muscle abdominal et grand glutéal) de sujets sains, prélevés lors d'interventions chirurgicales programmées avec un phénotypage minimal des sujets (sexe, âge, IMC, pathologies, médicaments).

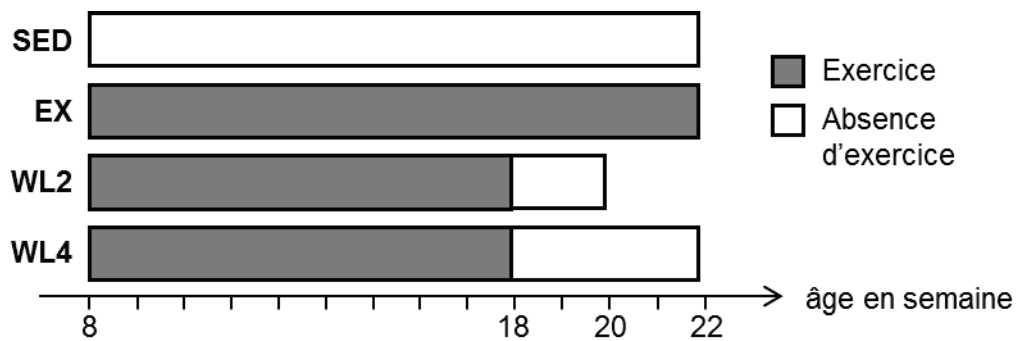
## 2. *Protocole animal*

Afin d'élucider l'implication des microARNs dans les effets de l'inactivité physique sur le muscle squelettique, nous avons exploré leur évolution au cours un protocole de désentraînement chez la souris (SEDENT).

Pour cela, 27 souris mâles C57BL/6 âgés de 5 semaines ont été hébergées et entretenues dans des conditions standards (température de 22°C, un cycle

journalier de 12h à la lumière/12h dans la pénombre, eau et nourriture à volonté). Toutes les procédures expérimentales ont été acceptées par un comité d'éthique local et réalisées en accord avec les législations nationale et européenne, tout au long du protocole.

Après une semaine d'acclimatation, les souris ont été séparées en deux groupes, et leur affectation a été réalisée au hasard (Figure 21).



**Figure 21. Déroulement de l'étude SEDENT.** L'étude a été menée chez 27 souris réparties en 4 groupes : SED, pas d'exercice (n=6) ; EX, exercice (n=7) ; WL2, exercice puis arrêt exercice pendant 2 semaines (n=7) ; WL4 exercice puis arrêt de l'exercice pendant 4 semaines (n=7). L'enregistrement quotidien des rotations de la roue d'activité mise à disposition dans les cages permet d'évaluer le niveau d'activité des souris. L'arrêt de l'exercice est obtenu par blocage des roues dans les cages.

Un groupe est constitué de souris ne faisant pas d'exercice volontaire, *i.e.* absence de roue d'activité ; ces souris sont considérées comme inactives (SED, n=6). Un autre groupe est constitué de souris ayant la possibilité de faire de l'exercice volontaire (n=21). Les souris sont hébergées individuellement dans des cages et les souris appartenant au groupe faisant de l'exercice ont accès à une roue d'activité de 15cm de rayon équipée d'un compteur de vélo BC800 (Sigma GmbH, Neustadt, Allemagne). Le nombre de rotation effectué par les roues est enregistré quotidiennement afin de calculer la distance parcourue par jour (km/j). Chez toutes les souris, le poids corporel (g) et la prise alimentaire (g/j) sont mesurés deux fois par semaine.

A la semaine 18, le groupe de souris actives est séparé de manière homogène (même niveau d'activité moyen, et même corpulence moyenne) en trois groupes de souris : un groupe qui continue l'exercice volontaire (EX, n=7), un groupe arrêtant l'exercice volontaire sur deux semaines (WL2, n=7) et un groupe arrêtant l'exercice volontaire sur quatre semaines (WL4, n=7). L'arrêt de l'exercice volontaire est obtenu en bloquant les roues dans les cages des souris des groupes WL2 et WL4.



Les souris des groupes SED, EX et WL4 sont sacrifiées à l'âge de 22 semaines, soit 16 semaines après le début du protocole. Les souris du groupe WL2 sont sacrifiées deux semaines avant à l'âge de 20 semaines, permettant ainsi d'avoir un groupe ayant arrêté l'exercice volontaire sur 2 semaines. Le jour du sacrifice, les tissus sont prélevés, congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Dans cette thèse, nous avons utilisé les échantillons de muscle *gastrocnemius lateralis*.

## B. Modèles cellulaires

### 1. *Lignées cellulaires*

Plusieurs lignées cellulaires ont été utilisées : la lignée musculaire L6, les cellules hépatiques HuH7 et les cellules de rein HEK293.

Les L6 sont des myoblastes (sous-clone C5) issus d'une lignée myogénique établie à partir de cellules de rats nouveau-nés, isolés en 1968 par Yaffe (Yaffe 1968). Leurs propriétés de différenciation *in vitro* sont bien connues, elles ont notamment gardé la capacité de fusionner pour former des myotubes différenciés.

Les L6 sont cultivées, en condition de prolifération, dans un milieu nutritif DMEM (Dulbercco's Modified Eagle Medium) contenant 4,5g/L de glucose, 10% de sérum de veau foetal décomplémenté (SVFd), 1% d'antibiotiques (100U/mL pénicilline et 100µg/mL de streptomycine) et 1% de Glutamine (200mM) à 37°C dans une atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub>. Lorsque les L6 sont en différenciation, le milieu est le même mais la supplémentation en sérum est de seulement 1%. De plus, 10<sup>-7</sup>M d'AVP (Arginine-8-Vasopressine), une hormone neurohypophysaire stimulatrice de la différenciation myogénique *in vitro*, sont ajoutés (Nervi et al. 1995).

Les cellules HuH7 sont des hépatocytes différenciés issus d'une lignée de carcinome hépatocellulaire isolée à partir d'une tumeur au foie d'un patient japonais de 57 ans, en 1982 par Nakabayashi et Sato (Nakabayashi et al. 1982). Cette lignée cellulaire est couramment utilisée pour étudier le cancer du foie et ses thérapies potentielles. Bien qu'exprimant un panel assez large des gènes spécifiques du foie et sécrétant la plupart des protéines plasmatiques, ce modèle reste limité car il s'éloigne de la physiologie normale des cellules du foie, notamment l'absence ou le très faible métabolisme des drogues dont l'alcool et les médicaments.

Les HuH7 sont cultivées dans du DMEM contenant 1g/L de glucose, 10 de SVFd, 1% d'antibiotiques (100U/mL pénicilline et 100µg/mL de streptomycine) et 1% de Glutamine (200mM) à 37°C dans une atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub>.

Les HEK293 (Human Embryo Kidney 293) sont des cellules embryonnaires humaines de rein, issues d'un fœtus sain avorté, qui ont été immortalisées par transformation avec de l'ADN fragmenté d'adénovirus de type 5 (Graham et al. 1977).

L'origine cellulaire de ces cellules étant mal définie, elles ne sont pas un bon modèle d'étude de la physiologie rénale ou de tout autre processus biologique, et à ce titre, ne représente pas un bon modèle d'étude en physiologie. En revanche, leur grande capacité de prolifération et leur facilité à être transfectées, en font un excellent outil en biologie moléculaire, notamment pour la production et l'amplification d'adénovirus. En effet, les adénovirus utilisés au laboratoire comme vecteurs d'expression sont rendus inoffensifs par délétion d'un certain nombre de gènes clés de la réplication. Les HEK293 expriment plusieurs de ces gènes adénoviraux, tels que E1 et E3, et permettent ainsi la réplication des adénovirus défectifs. Elles sont dites complémentantes.

Les HEK293 sont cultivées dans du DMEM contenant 4,5g/L de glucose, 10% de SVFd, 1% d'antibiotiques (100U/mL pénicilline et 100µg/mL de streptomycine) et 1% de Glutamine (200mM) à 37°C dans une atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub>.

## 2. Culture primaire

Une partie importante des expériences *in vitro* réalisées au cours de mon travail de thèse a été effectuée sur des cultures primaires humaines. Ces cultures primaires proviennent de la prolifération de cellules satellites isolées à partir de biopsies de muscle squelettique humain (*rectus abdominis* ou *gluteus maximus*) prélevées lors d'interventions chirurgicales programmées sur des sujets sains.

Les cellules satellites sont des cellules souches musculaires, qui sont capables de proliférer et de se différencier pour former des myotubes afin de régénérer le tissu musculaire. En culture, les cellules satellites ont également la capacité de proliférer et de se différencier en myotubes polynuclées contractiles.

En pratique, la biopsie musculaire est nettoyée des cellules sanguines par lavage avec du milieu de prolifération, et des tissus non musculaires par dissection.

Le prélèvement est ensuite fragmenté pour être digéré dans de la trypsine à 37°C. Après neutralisation de la trypsine avec du sérum et lavage au PBS (Phosphate-Buffered Saline), les cellules sont culottées par centrifugation. Le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu de prolifération (HamF10 supplémenté de 2% de SVF<sub>d</sub>, 2% UltrosorG et 1% d'antibiotiques) et les cellulesensemencées dans des flasques F25 Primaria. La sélection des cellules musculaires est réalisée via l'utilisation d'un anticorps dirigée contre la protéine de surface CD6 (Belles-Isles et al. 1993). Cet anticorps est couplé à des billes magnétiques permettant une immuno-sélection.

Les cellules sélectionnées grâce à un support aimanté sont alorsensemencées dans des plaques dont les puits sont recouverts de collagène, puis incubées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en présence de milieu de prolifération. L'état de confluence est contrôlé par observation microscopique. A quasi confluence, la différenciation est induite en changeant le milieu de prolifération par du milieu de différenciation, du DMEM contenant 1g/L de glucose, 1% de SVF<sub>d</sub>, 1% d'antibiotiques (100U/mL pénicilline et 100µg/mL de streptomycine) et 1% de Glutamine (200mM).

A cette étape, les myoblastes s'allongent et s'alignent puis fusionnent formant ainsi des myotubes polynuclées contractiles. Le processus de différenciation commence à confluence, et environ 48h après induction les premières fibres polynuclées sont formées. Les différentes études sont menées 5 à 7 jours après induction de la différenciation.

### C. Modulation de l'expression génique *in vitro*

Une partie de ce travail de thèse repose sur l'exploration *in vitro* des effets des microARNs, notamment leur implication dans des voies métaboliques. Pour cela, l'expression des microARNs est modulée soit positivement, surexpression par adénovirus ou plasmides, soit négativement par utilisation d'inhibiteurs de microARNs.

#### 1. *Construction de deux adénovirus recombinants codant pour miR-148b et miR-21 et infections adénovirales*

##### a. Généralités

Les infections à adénovirus sont souvent sans traduction clinique, 50% des infections étant asymptomatiques, et concernent généralement les voies aériennes supérieures et les muqueuses supérieures (pharyngites). Cette famille de virus a été découverte en 1953 par Wallace P. Rowe (Rowe et al. 1953), à partir de tissus adénoïdiens, les amygdales, expliquant l'origine du nom adénovirus.

En biologie moléculaire, les adénovirus sont utilisés comme vecteur de transfert de gène d'intérêt, permettant la surexpression de protéines dans des cellules, notamment quand la transfection par des méthodes classiques est difficile, par exemple dans la lignée de cellules L6.

Les adénovirus sont des virus non enveloppés à capsidie d'un diamètre d'environ 80 nanomètres. Ils sont endocytés par la cellule, puis relarguent leur ADN viral dans le noyau après désintégration de la capsidie. Le génome est un ADN double brin d'environ 36 Kb, constitué de deux régions différentes, les régions E (pour early) participant à la phase précoce du cycle de réplication du virus, et les régions L (pour late) intervenant dans la phase tardive.

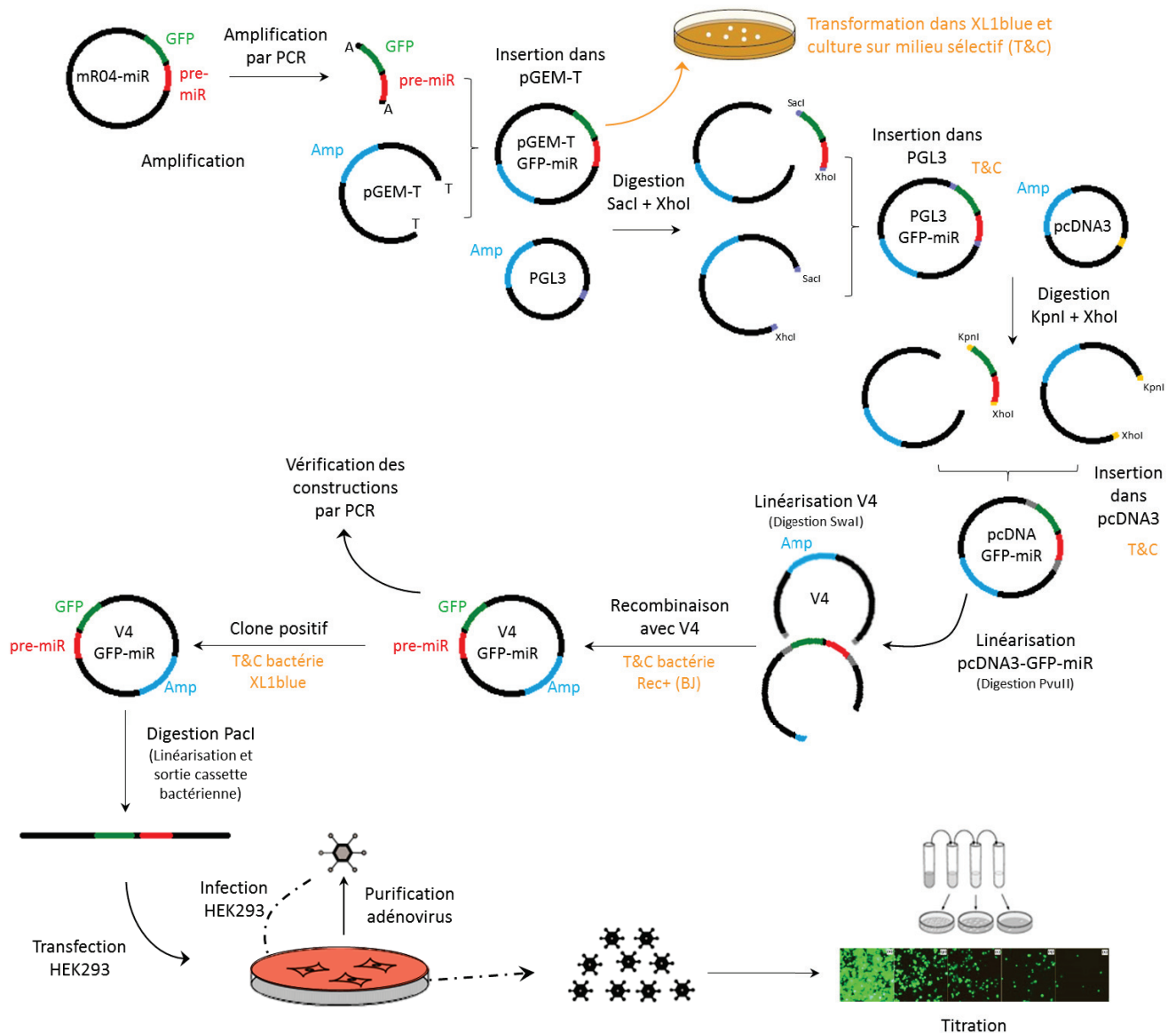
Afin d'éviter leur propagation, les adénovirus utilisés en laboratoire sont rendus incapables de réplication par la délétion d'une région du génome adénoviral : la région E1, impliquée dans la réplication du virus. La région E3, qui est impliquée dans la réponse immunitaire et non essentielle lors de la culture *in vitro* de l'adénovirus, est également délétée afin de permettre l'insertion de transgènes pouvant aller jusqu'à 8Kb.

L'adénovirus utilisé au laboratoire, VmAdcDNA3, a été mis au point par l'équipe du Dr S. Rusconi à l'université de Fribourg en Suisse (Chaussade et al. 2003) à partir d'un adénovirus humain de type 5 recombinant  $\Delta E1/E3$ . Au niveau de la région E1 délétée, une région de recombinaison homologue avec le plasmide pCDNA3.1 a été ajoutée. Il s'agit de deux éléments correspondant à une portion de 363bp en 5' du promoteur CMV (cytomégalovirus) et un segment de la région 3' comprenant le signal de polyadénylation du plasmide pCDNA3. Une séquence contenant un site de restriction *SwaI* sépare ces deux éléments. La recombinaison permet ainsi de supprimer le site de restriction *SwaI* et d'entraîner la reformation du promoteur CMV, ce qui peut être vérifié par PCR.

Les gènes d'intérêt doivent d'abord être clonés dans le plasmide pCDNA3 avant d'être transférés par recombinaison homologue dans le VmAdcDNA3.

#### b. Clonage des pre-miARNs de miR-148b et miR-21

Les vecteurs d'expression pCDNA3-miR-148b et pCDNA3-miR-21 ont été générés respectivement à partir des plasmides MR04-miR-148b (HmiR0185-MR04, precursor miRNA expression clone for hsa-mir-148b) et MR04-miR-21 (HmiR0284-MR04, precursor miRNA expression clone for hsa-mir-21), des plasmides générés par GeneCopoeia (Labomics, Nivelles, Belgique).



**Figure 22. Construction des adénovirus recombinant pour miR-148b et miR-21.** Les séquences codantes pour les pre-miARNs et la GFP ont été amplifiées par PCR puis transférées dans le plasmide pCDNA3.1 par différentes étapes de clonage et recombinées avec le plasmide VmAdcDNA3 (V4). La production des adénovirus a été réalisée par transfection de cellules HEK avec des clones positifs linéarisés.

Les fragments contenant les pre-miARNs, pre-mir-148b et pre-mir-21, et le gène codant pour la GFP (green fluorescent protein) ont été amplifiés par PCR (polymerase chain reaction) à partir de leur plasmide respectif (Figure 22). Les produits de PCR ont ensuite été clonés dans un plasmide pGEMT (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), puis séquencés pour vérifier les séquences. Ils ont ensuite été transférés par restriction-ligation dans un plasmide PGL3 (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), puis de nouveau transférés par restriction-ligation dans le plasmide pCDNA3.1 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

c. Génération des adénovirus recombinants pour miR-148b et miR-21

Une fois chacun des gènes d'intérêt cloné dans un plasmide pCDNA3, ils sont transférés dans le génome adénoviral par recombinaison homologue avec le plasmide VmAdcDNA3.

Pour chaque construction, 200 ng du plasmide VmAdcDNA3 est linéarisé par l'enzyme de restriction *SwaI*, et 600 ng des clones pCDNA3-gènes d'intérêt sont également linéarisés par une enzyme de restriction ne coupant pas dans la cassette « promoteur CMV-Gène-polyA  $\beta$ -Globine » du plasmide.

Des bactéries compétentes Rec<sup>+</sup> (exprimant la recombinaison), *Escherichia coli* BJ5183, sont co-transformés par le plasmide VmAdcDNA3 et le pCDNA-gènes d'intérêt linéarisés, puis inoculées sur des boîtes de pétri contenant du milieu LB agar (bouillon lysogène) + ampicilline.

Après une nuit à 37°C, les recombinants sont analysés par PCR avec le couple d'amorces suivant :

- l'amorce A, 5'-GACGGATGTGGCAAAAGTGA-3', s'hybridant à l'extrémité 5' du génome l'adénovirus
- l'amorce B, 5'ATGGGGTGGAGACTTGGAAATC-3', s'hybridant à la partie du promoteur CMV apportée par recombinaison.

Un fragment de 700bp est généré quand le clone est positif. Un clone positif est ensuite transformé et amplifié dans des bactéries compétentes *Escherichia coli* XL1-Blue.

Les plasmides obtenus (construction pour miR-148b et miR-21), sont ensuite digérés par l'enzyme de restriction *PacI* permettant l'exclusion de la cassette bactérienne de la construction, et sa transfection dans des cellules HEK293.

La production *in vitro* du virus recombinant n'est possible que dans les cellules HEK293. En effet, ces cellules sont modifiées génétiquement pour pouvoir compléter les génomes viraux car elles expriment les protéines E1 permettant ainsi la multiplication des adénovirus. Les cellules sont transfectées au phosphate de calcium, avec le plasmide coupé par l'enzyme *PacI*. Les effets cytopathiques, provoqués par la production du virus, sont observés pour évaluer le degré d'infection cellulaire, survenant généralement 8 à 10 jours après transfection. Les constructions étant recombinantes également pour le gène de la GFP, on peut suivre l'infection au microscope à fluorescence.

Lorsque la majorité des cellules sont sur le point d'être lysées, elles sont culottées par centrifugation puis lysées par plusieurs cycles de congélation/décongélation successifs dans du PBS-10%Glycérol, afin de récupérer la solution adénovirale. Les adénovirus produits étant recombinants pour la GFP, leur capacité à induire une surexpression des gènes d'intérêts, a pu être vérifiée par microscopie à fluorescence lors de la transfection. On peut également vérifier les constructions par digestion enzymatique.

Si la fonctionnalité de l'adénovirus est validée, l'adénovirus est alors amplifié et purifié afin de constituer un stock. Pour chaque construction, des HEK293 ensemencées dans 6 boîtes de culture de 10 cm de diamètre sont infectées avec la solution adénovirale, et de la même façon que décrite précédemment, lorsque la majorité des cellules sont sur le point d'être lysées, elles sont culottées par centrifugation puis lysées par plusieurs cycles de congélation/décongélation successifs.

#### d. Titration

La titration de la solution adénovirale consiste à déterminer le titre infectieux de la solution, *i.e.* la concentration de la solution en adénovirus viables (capables d'infecter une cellule). Des dilutions au 10<sup>ème</sup> en cascade, de 10<sup>-4</sup> à 10<sup>-13</sup>, de la solution concentrée d'adénovirus à titrer sont réalisées dans du milieu DMEM sans sérum. Des HEK293 ensemencées en plaque 96 puits sont infectées par 100µL de chaque dilution. Le principe repose sur le fait qu'au fur et à mesure des dilutions croissantes, arrivera une dilution ne contenant plus de particules adénovirales. Nous pouvons ainsi par observation des plages de lyse, *i.e.* marqueurs de la présence de particules adénovirales, déterminer le titre infectieux.

Chaque puits de la plaque 96 puits est traité avec un même volume, 100µL. Chaque colonne de la plaque 96 puits correspond à une dilution, où chaque puits, soit 8 répétitions, est infectée avec la même solution adénovirale diluée dans le DMEM. La première et la dernière colonne reçoivent du milieu DMEM sans dilution adénovirale servant de contrôle.

Les cellules sont suivies sur 10 jours afin de déterminer s'il y a des plages de lyse, signes de la présence d'au moins une particule adénovirale. La reconnaissance est ici facilitée par l'expression de la GFP. En déterminant les puits contenant au moins une particule adénovirale et les puits sans particule adénovirale on détermine grâce à la formule suivante le titre infectieux de la solution mère adénovirale.

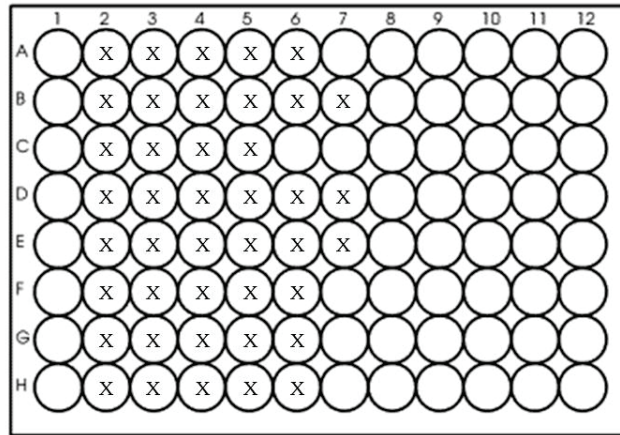
$$\text{Titre} = 10^{1+Z*(X-0,5)}$$

Avec  $Z = \log(\text{facteur de dilution})$  pour des dilutions successives au  $10^{\text{ème}}$   $Z=1$

$$\text{Et avec } X = \sum_{d=1}^{\text{nombre de dilution}} \frac{\text{nombre de puits positifs}}{8}$$

Prenons un exemple :

Dilution 0 10<sup>-3</sup> 10<sup>-4</sup> 10<sup>-5</sup> 10<sup>-6</sup> 10<sup>-7</sup> 10<sup>-8</sup> 10<sup>-9</sup> 10<sup>-10</sup> 10<sup>-11</sup> 10<sup>-12</sup> 0



$$\text{Ici } X = (1 + 1 + 1 + 1 + 1 + 1 + 0,875 + 0,375 + 0 + 0 + 0 + 0) = 7,25$$

$$\text{et } Z = \log(10) = 1$$

$$\text{Titre} = 10^{1+1*(7,25-0,5)} = 10^{7,75} = 5,6 \cdot 10^7 \text{ pfu/mL}$$

## 2. Surexpression par infections adénovirales dans les lignées cellulaires

Les L6 différenciés sont infectées par adénovirus recombinants. Les cellules sont infectées avec 1µL, soit respectivement 7,5.10<sup>8</sup>UI pour l'adénovirus exprimant miR-148b et 5,6.10<sup>8</sup>UI pour l'adénovirus exprimant miR-21, d'adénovirus par puits, en plaque 6 puits. Une infection par adénovirus surexprimant seulement la GFP est réalisée comme contrôle négatif de l'infection. Les différentes expérimentations sont réalisées après 48h d'infection.

## 3. Surexpression par transfection de plasmides codant miR-148b et miR-21

Les myotubes humains différenciés sont transfectés avec le plasmide MR04-miR-148b (HmiR0185-MR04, precursor miRNA expression clone for hsa-mir-148b) et un plasmide contrôle (CmiR0001-MR04, miRNA scrambled control clone for pEZX-MR04) de chez GeneCopoeia (Labomics, Nivelles, Belgique). Les cellules HuH7 sont transfectées avec les mêmes plasmides, ainsi que le plasmide MR04-miR-21 (HmiR0284-MR04, precursor miRNA expression clone for hsa-mir-21).

Les HuH7 et les myotubes différenciés sont transfectés respectivement avec 1µL et 2µL de plasmide par puit, en plaque 6 puits, avec l'agent transfectant Exgen



500 selon le protocole du fabricant (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Les différentes expérimentations sont réalisées après 48h de transfection.

#### 4. *Inhibition par utilisation d'anti-miRs*

Pour réaliser l'inhibition de l'expression des microARNs, nous avons utilisé des inhibiteurs de microARNs (miRCURY LNA microRNA Inhibitors) de chez Exiqon (Vedbæk, Denmark). Ces inhibiteurs sont constitués de courtes séquences nucléotidiques complémentaires s'hybridant de manière irréversible sur le microARN cible. Un nucléotide dont le cycle ribose est contraint par un pont méthylène entre 2'-O et 4'-C est incorporé dans l'ARN antisens, correspondant à l'inhibiteur du microARN, par la technique Locked Nucleic Acid (LNA). Cette contrainte de conformation confère à l'oligonucléotide une plus grande stabilité thermique, permettant d'augmenter l'efficacité d'inhibition du microARN cible, compte tenu de sa faible longueur (22 nucléotides en moyenne). Les inhibiteurs sont marqués en 5' avec de la fluorescéine permettant de s'assurer de la bonne efficacité de transfection.

Les myotubes humains différenciés sont transfectés avec l'inhibiteur de miR-148b (hsa-miR-148b-3p miRCURY LNA microRNA inhibitor, 5'-fluorescein labeled) et l'inhibiteur contrôle (Negative control A miRCURY LNATM microRNA inhibitor control, 5nmol, 5'-fluorescein labeled). Les cellules HuH7 sont transfectées avec les mêmes inhibiteurs, ainsi que l'inhibiteur du miR-21 (hsa-miR-21-5p miRCURY LNA microRNA inhibitor, 5'-fluorescein labeled).

Les HuH7 et les myotubes différenciés sont transfectés avec 100pmoles d'inhibiteur par puit, en plaque 6 puits, avec l'agent transfectant Hiperfect selon le protocole du fabricant (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les différentes expérimentations sont réalisées après 48h de transfection.

#### D. Analyse de la signalisation de l'insuline

Des mesures *in vitro* de sensibilité à l'insuline sont réalisées sur les cellules musculaires humaines en culture primaire qui ont été transfectées soit avec les plasmides exprimant les microARNs soit avec les inhibiteurs de microARNs. La veille des extractions protéiques, les cellules ont été incubées sur la nuit dans du milieu complet de différenciation ne contenant pas de sérum.

Le lendemain, les myotubes différenciés sont stimulés ou non avec de l'insuline (10 ou 100  $\mu$ M) pendant 10 minutes à 37°C. A la fin de l'expérience, les protéines sont

extraites par la méthode décrite ci-dessous en partie F.1 puis la quantification de la phosphorylation de la PKB et de la MAPK est réalisée par Western-Blot.

#### E. Mesure d'expression génique et protéique

La signature génique ou protéique liée au niveau d'activité physique dans les protocoles humains et animaux, ou associée au niveau d'expression de miR-148b dans les cellules a été évaluée respectivement par RT-PCR en temps réel (RT-qPCR) et par western-blot. Dans un premier temps, la quantification individuelle de l'expression des gènes par RT-qPCR, utilisée dans les modèles humains et cellulaire est présentée, puis l'analyse transcriptomique des microARNs réalisée dans le protocole LIPOX, et basée sur le principe de la RT-qPCR, est détaillée et enfin la quantification des protéines utilisée dans le protocole chez la souris et dans les cellules est expliquée.

##### 1. *Mesure de l'expression génique par PCR quantitative en temps réel*

###### a. Extraction des ARN totaux

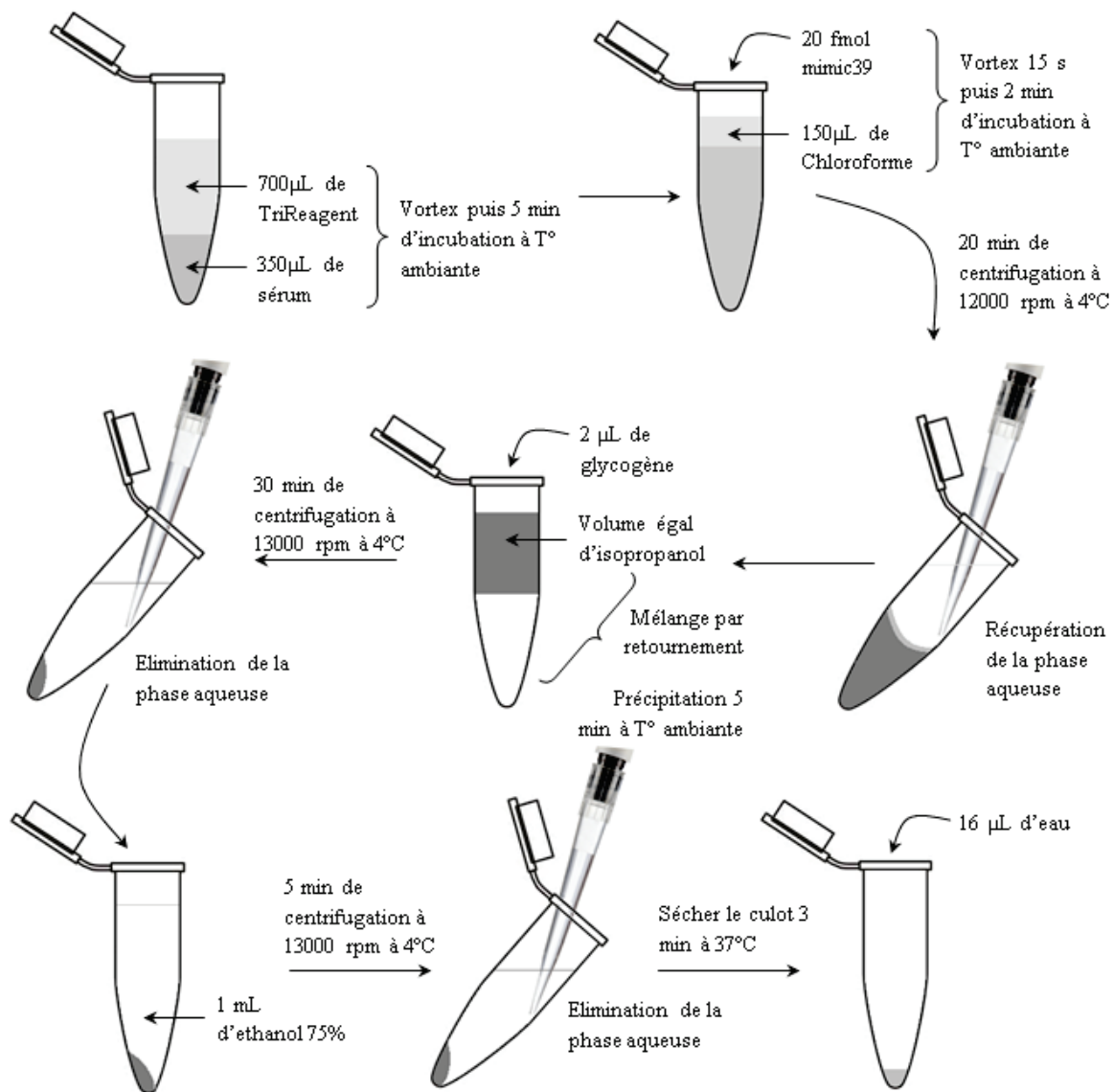
###### i. *Cellules*

Les extractions des ARNs totaux à partir des cellules musculaires humaines en culture primaire, des L6 et des HuH7, ou à partir du muscle *gastrocnemius lateralis* des souris (SEDENT) ont été réalisées à l'aide de Tri Reagent (Sigma, St Quentin Fallavier, France), selon les recommandations du fournisseur. Les extractions des ARNs totaux à partir des biopsies de muscle humain *Vastus lateralis* (LIPOX) ont été réalisées avec le kit mirVana miRNA Isolation Kit protocol (Life Technologies, Saint Aubin, France).

Les ARNs ont ensuite été dosés par spectrophotométrie à 260nm, au nanodrop ND2000 (Labtech, Palaiseau, France).

###### ii. *Sérum (miRNAs)*

Les extractions des ARNs totaux à partir des sérums ont été réalisées à l'aide de Tri Reagent (Sigma, St Quentin Fallavier, France) selon un protocole adapté pour des extractions sur les fluides (Figure 23). La purification a été réalisée sur 350µL de sérum, auquel 20 fmol d'un ARN de synthèse exogène (*C. elegans* miR-39 miRNA mimic, Qiagen, Tableau 3) ont été ajoutés, permettant de valider la qualité de l'extraction.



**Figure 23. Adaptation du protocole d'extraction des ARNs totaux au TriReagent, pour l'extraction des microARNs dans le sérum.** L'ajout d'une solution monophasique de phénol et de thiocyanate de guanidine (TriReagent) permet de solubiliser le matériel biologique et de dénaturer les protéines, puis l'ajout de chloroforme permet de séparer trois phases : une phase organique contenant les protéines, une interphase contenant l'ADN et une phase aqueuse contenant l'ARN. L'isolation des ARNs totaux est réalisée par ajout de glycogène et d'isopropanol permettant leur précipitation, puis le culot est lavé à l'éthanol, et resuspendu dans de l'eau. Un ARN de synthèse exogène est ajouté pour valider la qualité de l'extraction.

**Tableau 3. Référence de la séquence mimic 39 de *Caenorhabditis Elegans* et des amorces pour RT et qPCR TaqMan**

Type	Dénomination	Fournisseur	Référence	Séquence
Séquence	Syn-cel-mir-39 miScript miRNA mimic	Qiagen	MSY0000010	5'-UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3'
Amorces	Cel-mir-39 ID 000200	Life tech/Applied	MI0000010	

## b. Transcription inverse

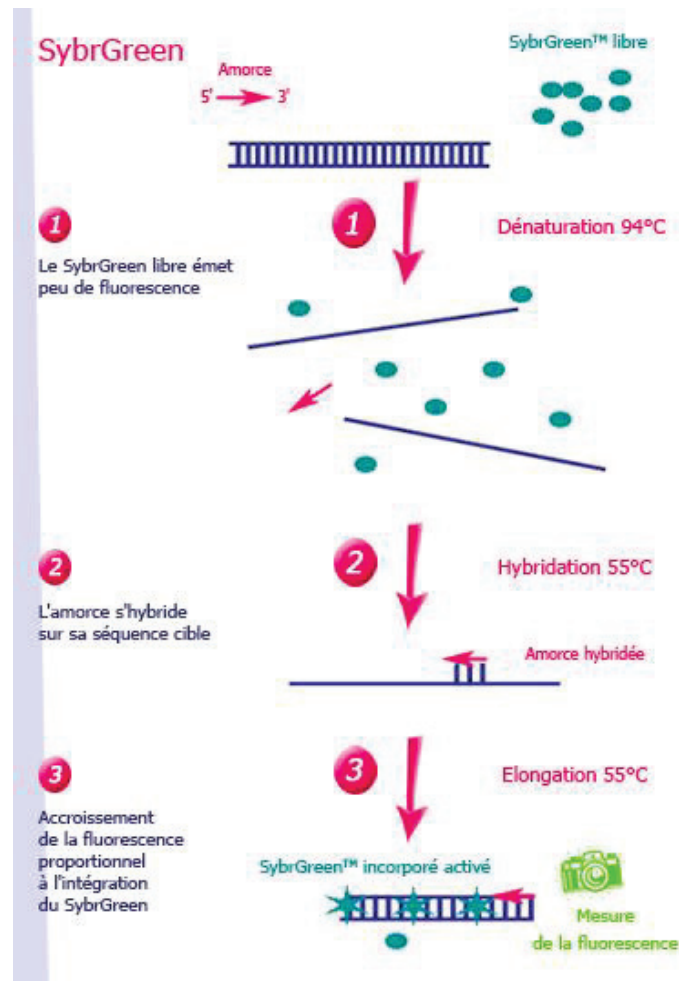
La transcription inverse (reverse transcription, RT) est réalisée à partir d'1µg d'ARN total, de manière non spécifique (à l'exception des RT pour la quantification des microARNs, expliquée en partie E.3), en présence de SuperScript II® RNase H-Reverse Transcriptase (100U, Invitrogen), d'un mélange d'oligoT (Promega) et d'hexamères oligonucléotidiques non spécifiques.

### 2. *RT-qPCR en temps réel des gènes*

La PCR quantitative en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent, le Sybr green, incorporé à chaque cycle d'amplification (Figure 24).

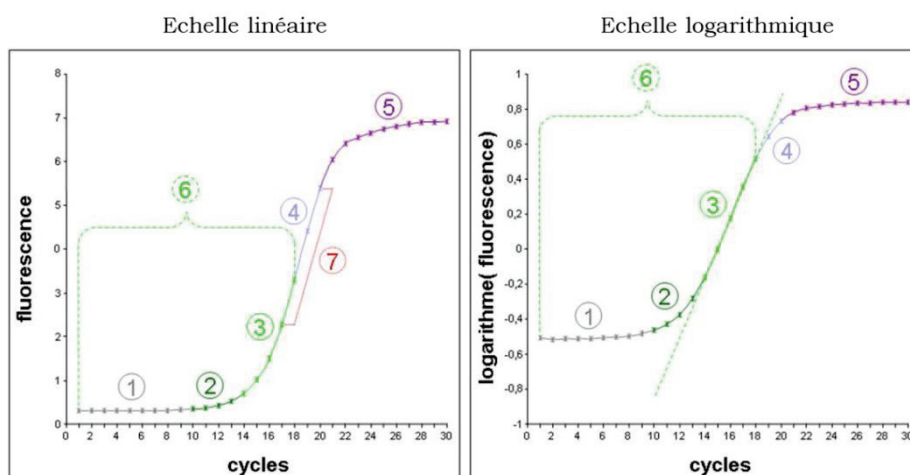
L'observation de la quantité de fluorescence émise à chaque cycle permet de déterminer la cinétique d'amplification de la PCR afin de déterminer la zone d'amplification exponentielle pendant laquelle l'augmentation du signal est proportionnelle à la quantité d'ADN complémentaire (ADNc) présente au début de la réaction. Un logiciel permet d'établir une valeur de Ct (threshold cycle = cycle seuil), correspondant au cycle au cours duquel la fluorescence est supérieure au bruit de fond (Figure 25). La valeur de Ct de l'échantillon est ensuite transformée en nombre de molécules à l'aide d'une courbe standard amplifiée en parallèle.

Les ARN messagers sont quantifiés en utilisant des amorces spécifiques des ADNc étudiés. La PCR quantitative est réalisée sur 5µL du produit de RT dilué au 1/60<sup>ème</sup> mélangé à 15µL de milieu réactionnel ABsolute™ QPCR SYBR® Green Mix (Qiagen, Courtaboeuf, France), à l'aide d'un Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les amplifications sont analysées avec le logiciel Rotor-Gene Q Series Software (Qiagen, Courtaboeuf, France) (Figure 25).



**Figure 24. Principe de la PCR quantitative en temps réel basée sur l'utilisation de l'intercalant SybrGreen.** Le SybrGreen est un agent intercalant dont l'émission de fluorescence augmente lorsqu'il est lié à l'ADN double brin, et donc proportionnellement avec la quantité d'ADN double brin synthétisé lors de la PCR.

*Institut Louis Malardé*



**Figure 25. Cinétique de PCR en temps réel, selon une échelle linéaire à gauche et logarithmique à droite.** 1, Bruit de fond de la fluorescence aspécifique du marqueur ; 2, Zone où le bruit de fond biaise la mesure de fluorescence ; 3, Phase exponentielle où la cinétique est mesurable sans biais ; 4, La polymérase devient un facteur limitant ; 5, Plateau de la cinétique ; 6, Phase de la cinétique répondant réellement à une loi exponentielle ; 7, Zone linéaire sur le schéma de gauche mais non quantifiable.

### 3. RT-qPCR en temps réel des microARNs

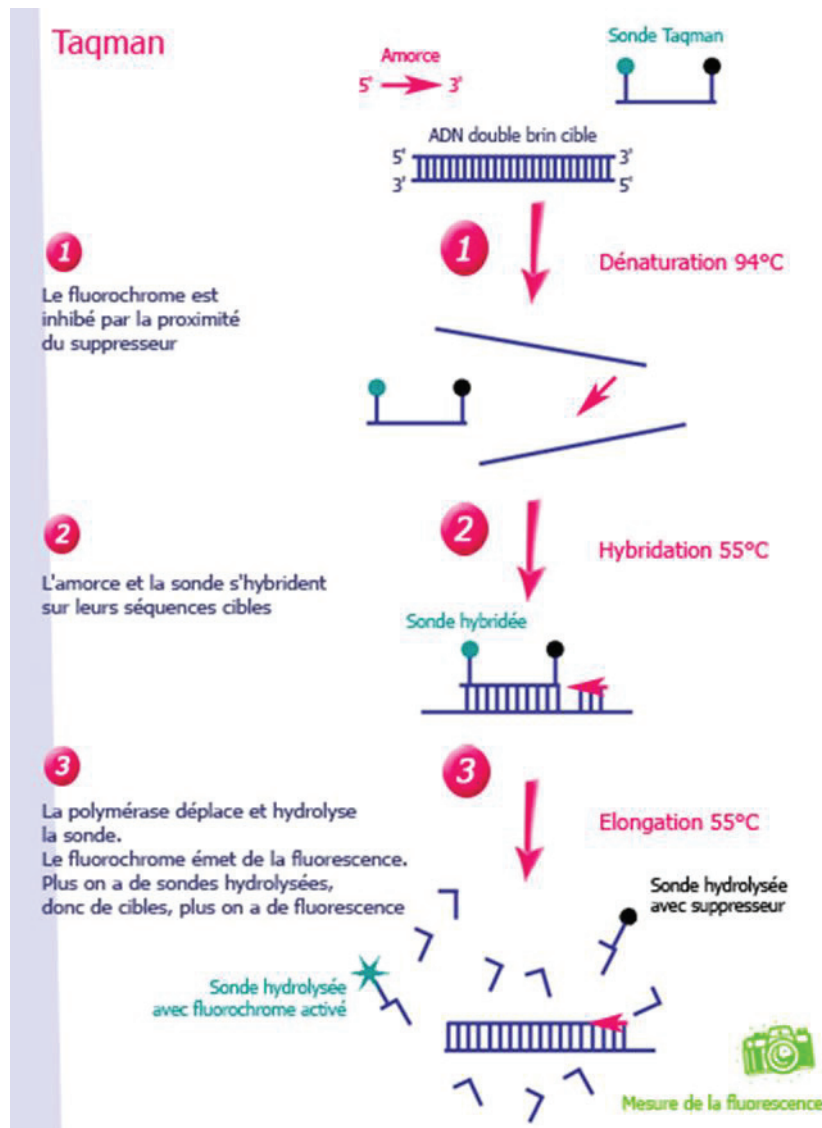
La quantification des microARNs requiert une étape de transcription inverse spécifique. Les microARNs sont rétrotranscrits en présence du mix de réaction TaqMan mix RT 200 (10X), d'un mélange de dNTPs (100mM), de la Rnase inhibitor (20U/ $\mu$ L), de multiscribe RTase (50U/ $\mu$ l) et d'amorces RT Mir essai (5X) spécifiques (Tableau 4, Life Technologies, Saint Aubin, France). Les microARNs étant différentiellement exprimés selon le type de tissu étudié, il est nécessaire de mettre au point le dosage pour chaque microARN et chaque tissu. L'objectif est de déterminer la quantité d'ARN (entre 1pg et 5 $\mu$ g) à utiliser pour la RT et la dilution optimale ( $1/2$  au  $1/128^{\text{ème}}$ ) de la RT pour la qPCR. Le cycle de la transcription inverse pour les microARNs est : 30 min à 16°C, 30 min à 42°C et 5 min à 85°C.

**Tableau 4. Réactifs utilisés pour la technologie TaqMan.**

Type	Dénomination	Référence
Cartes	TaqMan Human miRNA Array A + B	4400238
Mix	TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG	4324018
Mix	TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, 200 Reactions	4366596
Mix	TaqMan PreAmp Master Mix Kit	4384267
Amorces	Megaplex PreAmp Primers, Human Pool Set v2.0	4400927
Amorces	Megaplex RT Primers, Human Pool Set v2.0	4400928

La PCR quantitative en temps réel pour la quantification des microARN est basée sur la technologie de sonde TaqMan. Comme pour la qPCR basée sur le sybr green, elle est basée sur la détection et la quantification d'un signal fluorescent à chaque cycle d'amplification. Cependant, dans cette technique le fluorophore est incorporé dans une sonde, spécifique de la séquence cible, et la fluorescence est émise lors de la lyse de la sonde, induite lors de la synthèse du brin d'ADN (fonction exonucléase 5' à 3' de la polymérase) (Figure 26).

Ainsi, les ARN messagers sont quantifiés en utilisant des amorces spécifiques des ADNc étudiés, et contenant un fluorophore. La PCR quantitative est réalisée sur 5 $\mu$ L du produit de RT dilué au  $1/16^{\text{ème}}$  mélangé à 15 $\mu$ L de milieu réactionnel TaqMan PCR Master Mix (2X), Amorces TaqMan assay (20x) spécifiques (Life Technologies, Saint Aubin, France). Le cycle de la qPCR pour les microARNs est : 15 sec à 95°C, puis 40 cycles de 10 min à 95°C, et enfin 60 sec à 60°C.



**Figure 26. Principe de la PCR quantitative en temps réel basée sur les sondes TaqMan.** Au cours de l'élongation, la sonde TaqMan liée de façon spécifique à l'ADNc est coupée libérant un reporter qui émet de la fluorescence. La fluorescence est proportionnelle au nombre de sondes hydrolysées donc à la quantité de produit d'amplification.

*Institut Louis Malardé*

#### 4. Analyse transcriptomique des microARNs par puces à ADN

##### a. PCR quantitative en temps réel par cartes TLDA

Les puces à ADN de type cartes microfluidiques développées par Applied Biosystems, préchargées en sonde TaqMan (TLDA, TaqMan Low Density Array) permettent de mesurer simultanément l'expression de 384 microARNs (gènes de référence et gènes d'intérêt).

En bref, les ARN totaux des sérums de 6 sujets actifs (NA) et 4 sujets inactifs (NS), avant et après intervention sur le niveau d'activité physique (étude LIPOX), sont analysés par PCR quantitative en temps réel par l'utilisation de deux cartes

TLDA (soit 671 microARNs d'intérêt) et du thermocycleur Applied Biosystems 7900HT (Life technology, Saint Aubin, France).

Entre 1 et 350 ng d'ARN sont déposés dans chacun des puits de la carte. Les microARNs sont rétrotranscrits en présence du mix de réaction TaqMan mix RT 200 (10X), d'un mélange de dNTPs (100mM), de la Rnase inhibitor (20U/ $\mu$ L), de  $MgCl_2$  (25mM) selon le protocole du fournisseur (Tableau 4, Life Technologies, Saint Aubin, France). Les ADNc des microARNs sont ensuite préamplifiés en présence du mix de réaction TaqMan PreAmp Master Mix, de primers (A ou B selon la carte TLDA). Enfin les ADNc préamplifiés sont quantifiés par ajout du milieu réactionnel TaqMan PCR Master Mix (2X) et de 75 $\mu$ L de tampon TE 0,1X (Tableau 4, Life Technologies, Saint Aubin, France).

Les courbes d'amplifications des niveaux d'expression des microARNs ont été analysés à l'aide du logiciel RQ Manager (Applied Biosystems). Les données générées sont exprimées de la même façon que pour une PCR quantitative en temps réel classique.

L'évaluation de la qualité des données est la première étape d'analyse. Seuls les microARNs dont les profils d'amplification étaient corrects, *i.e.* où le signal de fluorescence n'était pas saturé et hors du bruit de fond, et suivant une courbe sigmoïde, ont été conservés pour les analyses. De plus, les microARNs présentant des valeurs de Ct supérieures à 37, et les valeurs de Ct aberrantes ont été éliminés. Ainsi, sur les 671 microARNs testés, seulement 239 ont été utilisés pour la suite des analyses.

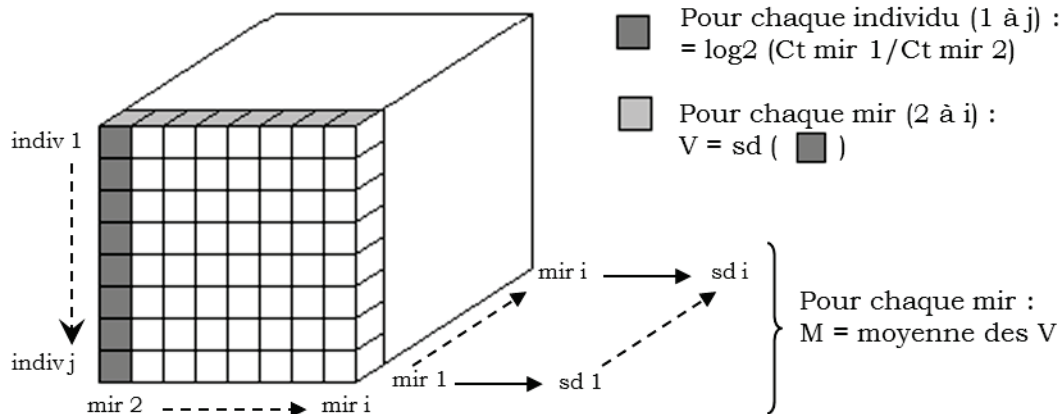
#### b. Sélection du microARN endogène de référence

L'analyse quantitative de l'expression des gènes nécessite le contrôle d'un certain nombre de facteurs, tels que la quantité de matériel génétique de départ ou encore l'efficacité de réaction. Il existe de nombreuses méthodes pour normaliser les données, avec de nombreuses limites.

A ce jour, la méthode la plus fréquemment utilisée est le recours à un contrôle interne (gène endogène). Ce contrôle interne ne doit pas varier entre les tissus ou cellules étudiés, et/ou en réponse au traitement expérimental. Dans notre cas, nous avons souhaité trouver un microARN dont l'expression ne varie pas avec le niveau d'activité physique, *i.e.* ne varie pas entre les groupes (NA vs NS) et entre les conditions avant et après intervention (NA pre vs NA post et NS pre vs NS post).



Pour cela, la méthode de Vandesompele et al. (2002), permettant d'identifier les gènes dont l'expression est la plus stable dans un jeu de données, a été utilisée et adaptée (cf. script en Annexe).



**Figure 27. Schéma de la méthode de Vandesompele et al. (2002).** Cette méthode permet de classer les microARNs selon la stabilité de leur expression dans un jeu de données. Un facteur de stabilité M défini comme la moyenne des coefficients de variations V du microARN est calculée pour chaque microARN. Le microARN le moins stable est ensuite retiré du jeu de données et un nouveau facteur de stabilité est recalculé, et ainsi de suite jusqu'à l'établissement d'un classement. Exemple pour mir n°1.

Cette méthode repose sur le calcul d'un facteur de stabilité d'un gène par rapport aux niveaux d'expression non normalisés des autres gènes, d'un jeu de données (Figure 27). Pour chaque gène, un coefficient de variation V (par paire) est calculé, et correspond à la déviation standard du logarithme base 2 du ratio entre son niveau d'expression (Ct) et celui de chaque gène, pris un à un. Le facteur de stabilité M d'un gène se définit alors comme la moyenne de ses coefficients de variations. Les gènes présentant les valeurs les plus faibles sont les plus stables. Ainsi, à chaque étape, le gène présentant la plus grande valeur est éliminé et les facteurs de stabilité de chaque gène sont recalculés. Au final, un classement des gènes, du plus stable au moins stable est établi, avec les deux premiers gènes possédant le même facteur de stabilité, dû à la méthode de calcul.

Cette méthode a été développée initialement pour déterminer un nombre minimum de gènes requis pour calculer un facteur de normalisation, puis sélectionner les mieux classés. Cependant, dans notre cas, nous avons choisi d'utiliser ce classement pour identifier parmi les microARNs les plus stables, un candidat qui n'est pas relié dans la littérature à des facteurs d'inflammation, et qui serait potentiellement stable chez les sujets en surpoids.

Ensuite, les niveaux d'expression des microARNs sont normalisés par rapport au niveau d'expression du miARN endogène de référence. Dans un premier temps, un delta de Ct  $\Delta Ct$  est calculé, et correspond à la différence entre la valeur de Ct du microARN d'intérêt moins celle du microARN endogène de référence. Puis, le Ct normalisé est ensuite calculé et correspond au chiffre 2 à la puissance négative de ce  $\Delta Ct$  :

$$\Delta Ct = Ct \text{ microARN intérêt} - Ct \text{ microARN endogène de référence}$$
$$Ct \text{ normalisé} = 2^{-\Delta Ct}$$

Le microARN endogène de référence identifié grâce aux cartes TLDA est hsa-miR-301a-3p. Il a été utilisé pour normaliser l'expression des microARNs d'intérêt dans le sérum pour l'analyse transcriptomique par cartes TLDA, et dans les quantifications individuelles par RT-qPCR dans les sérums de LIPOX, et des protocoles de Nouvelle-Zélande et de St Etienne.

#### c. Sélection des microARNs d'intérêts

Une fois les données des cartes TLDA normalisées des modèles mixtes ont été développés pour identifier les microARNs dont l'expression diffère entre les sujets NA (n=6) et NS (n=4) en basal, i.e. avant modification du niveau d'activité, mais également pour identifier les microARNs dont l'expression a été modifiée avec l'intervention, en ajustant sur le groupe.

#### F. Mesure de l'expression protéique par Western Blot

##### 1. *Préparation des extraits protéiques*

Les cellules sont lysées dans du tampon de lyse de composition suivante : PBS, SDS 0.1%, sodium deoxycholate 0.5%, Nonidet NP40 1%, EDTA 5 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM, NaF 20 mM, dithiothreitol DTT 1mM, auquel est ajouté un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France).

Les biopsies de souris ont été lysées dans du tampon de lyse de composition suivante : NaCl, SDS 0.1%, sodium deoxycholate 0.5%, Nonidet NP40 1%, Tris 50mM, auquel est ajouté un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France).

Les protéines sont quantifiées par la méthode de Bradford, à l'aide du kit BioRad Protein Assay (Bio-Rad laboratory, Marne-la-Coquette, France).

## 2. *Western Blot*

Les échantillons protéiques sont dénaturés à 100°C pendant 10 minutes en présence de tampon Laemmli 1X : Tris-HCl 50mM, Glycérol 12%, SDS 1%,  $\beta$ mercaptoéthanol 4%, Bleu de BromoPhénol 0,01%, pH 6,8.

Les protéines sont ensuite séparées selon leur masse moléculaire sur un gel d'acrylamide-bis-acrylamide de type SDS-PAGE puis transférées sur membrane PVDF (fluorure de polyvinylidène).

La membrane est ensuite saturée dans du Tris-Buffered Saline – 0,5% Tween – 4% BSA (boeuf serum albumine). La membrane est incubée toute la nuit à -4°C en présence de l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt, puis en présence d'un anticorps secondaire conjugué à la Peroxidase pendant 1h à température ambiante.

La présence des protéines est révélée par chimioluminescence dû à la réaction enzymatique entre la peroxydase et son substrat (kit ECL de Pierce, Rockford, IL, USA). Le signal est détecté par autoradiographie et quantifié grâce au logiciel Image J (W. Rasband, National Institute of Health, USA).

## G. Analyses des résultats et statistiques

### 1. *Analyses des gènes cibles et voies de signalisation*

Les cibles des microARNs d'intérêt sélectionnés ont été recherchées *in silico* avec les logiciels TargetScan, un logiciel de prédiction (Agarwal et al. 2015) et miRTarBase, une base de données recensant les gènes cibles des microARNs (Hsu et al. 2014).

Afin d'identifier une ou plusieurs fonctions biologiques qui seraient associées de façon spécifique à ces microARNs, nous avons ensuite fait une analyse d'enrichissement à partir des listes de gènes cibles prédits et validés en utilisant différents logiciels comme Babelomics (Alonso et al. 2015) et DAVID (Huang da et al. 2009). Ces outils reposent sur l'exploitation des annotations fonctionnelles disponibles sur les gènes dans les bases de données publiques afin de trouver les fonctions communes et spécifiques à une liste de gènes.

Nous avons également utilisé le logiciel DIANA-mirPath qui est un logiciel d'analyse des voies de signalisation des microARNs (Vlachos et al. 2015).

## 2. *Analyses statistiques*

Les analyses statistiques ont été effectuées soit avec le logiciel SAS V9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC) soit avec le logiciel R V2.15.2 (The R Foundation for Statistical Computing). Le seuil de significativité a été fixé à 5% pour les différentes analyses. Les données sont présentées avec leur moyenne  $\pm$  SEM.

Les données des protocoles cliniques ont été analysées à l'aide de modèles linéaires mixtes prenant en compte le caractère répété des données individuelles au cours du temps, les variables groupe et intervention comme effets fixes et les individus en effet aléatoire. Des tests post-hoc de Tukey ont été utilisés pour déterminer les différences entre les groupes en basal, *i.e.* avant intervention, et tester les effets de l'intervention dans chaque groupe. Des modèles mixtes ont également été utilisés pour examiner les associations entre les variables ou entre les changements induits par l'intervention sur ces variables permettant de tenir en compte le caractère répété des données.

Les données *in vitro* ont également été analysées à l'aide de modèles mixtes permettant de prendre en compte le caractère répété des données, avec les traitements comme effets fixes et les individus en effet aléatoire.



# RESULTATS



# ARTICLE 1

Effect of enforced physical inactivity induced by 60-d of bed rest on hepatic markers of NAFLD in healthy normal-weight women

**Effets d'une inactivité physique induite par un alitement prolongé de 60 jours sur les marqueurs hépatiques de maladie hépatique non alcoolique (NAFLD) chez des femmes en bonne santé normo-pondérées.**

Floriane Rudwill, Audrey Bergouignan, **Caroline Gastebois**, Guillemette Gauquelin-Koch, Etienne Lefai, Stéphane Blanc and Chantal Simon

Publié : Liver International 35(6), 1700–1706, Juin 2015





## **Principaux résultats**

- **L'inactivité sévère** secondaire à un protocole d'alitement prolongé (60 jours de **bed-rest**) induit une **augmentation de marqueurs hépatiques** associés à la stéatose hépatique (transaminases AST et ALT), à la stéato-hépatite (CK18) et à des formes plus sévères d'hépatite stéatosique non alcoolique (ANGPLT3) chez des femmes normo-pondérées en bonne santé, et ce **indépendamment de toute variation de masse grasse**.

- **L'inactivité physique sévère** liée au bed-rest induit une augmentation de **deux indices combinés de stéatohépatite**, les indices **AAC** et **CHA**, ce dernier intégrant un indice d'insulino-résistance des sujets.

- Un exercice combiné associant un **exercice en résistance** et un **exercice en aérobie**, utilisé comme **contre-mesure** de l'alitement prolongé, **prévient au moins partiellement l'augmentation** des différents marqueurs de maladie hépatique.

- Les **changements des triglycérides** induits par l'alitement prolongé sont **associés** avec les **changements** des concentrations plasmatiques de la **transaminase aspartate transférase** suggérant ainsi l'implication de **l'hypertriglycéridémie** dans l'altération précoce du métabolisme hépatique induite par **l'inactivité physique**.

- Les changements des deux indices combinés de NAFLD, chez les contrôles, dont l'un des deux inclut un marqueur d'insulino-résistance, sont également associés avec l'augmentation des triglycérides plasmatiques indiquant un **lien entre la sensibilité à l'insuline, le stockage ectopique des graisses et la stéatohépatite**.

- Les résultats de cette étude montrent un rôle de **l'inactivité physique** dans le **développement des atteintes hépatiques associés au syndrome métabolique, indépendamment** des effets de l'activité physique sur la **balance énergétique**.





## NAFLD/NASH

**Effect of enforced physical inactivity induced by 60-day of bed rest on hepatic markers of NAFLD in healthy normal-weight women**Floriane Rudwill<sup>1,2\*</sup>, Audrey Bergouignan<sup>3\*</sup>, Caroline Gastebois<sup>4</sup>, Guillemette Gauquelin-Koch<sup>5</sup>, Etienne Lefai<sup>4</sup>, Stéphane Blanc<sup>1,2\*</sup> and Chantal Simon<sup>4\*</sup>

1 University of Strasbourg, IPHC, Strasbourg, France

2 CNRS, UMR 7178, Strasbourg, France

3 Anschutz Health and Wellness Center, University of Colorado Anschutz Medical Campus, Box C263, Aurora, CO, USA

4 CARMEN, INSERM U1060, University of Lyon 1, INRA1397, CRNH-RA, Oullins, France

5 CNES, Paris, France

**Keywords**

angiopoietin-like 3 – cytokeratin 18 – exercise – physical inactivity – steatohepatitis – transaminases

**Abbreviations**

AAC, alanine transaminase, aspartate transaminase and cytokeratin 18 index; ALT, alanine transaminase; ANGPTL3, angiopoietin-like 3; AST, aspartate transaminase; BM, body mass; BR30, 30-days of bed rest; BR60, 60-days of bed rest; CHA, cytokeratin 18, homeostasis model assessment of insulin resistance and aspartate transaminase index; CK18, cytokeratin 18; FFM, fat free mass; FM, fat mass; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; LPL, lipoprotein lipase; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NASH, non-alcoholic steatohepatitis.

**Correspondence**Chantal Simon, Service d'Endocrinologie, Diabète, Nutrition, Centre Hospitalier Lyon Sud, 165 Chemin du Grand Revoyet, 69600 Oullins, France  
Tel: +33426235917  
Fax: +33426235916  
e-mail: chantal.simon@univ-lyon1.fr

Received 17 September 2014

Accepted 17 November 2014

DOI:10.1111/liv.12743

Liver Int. 2015; 35: 1700–1706

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the hepatic component of the metabolic syndrome and a progressive and chronic liver disease that goes from simple hepatic steatosis to non-alcoholic steatohepa-

\*F. Rudwill and A. Bergouignan contributed equally to this work as first authors and S. Blanc and C. Simon as last authors.

**Abstract**

**Background & Aims:** Physical inactivity leads to a cluster of metabolic disorders that have been associated with non-alcoholic fatty liver diseases. We tested whether physical inactivity increases hepatic biomarkers of NAFLDs. **Methods:** Sixteen normal-weight healthy women (body mass index =  $21.2 \pm 0.5$  kg/m<sup>2</sup>) were studied under controlled energy balance conditions during a previous 60-day bed rest with ( $n = 8$ ) or without ( $n = 8$ ) a combined aerobic/resistive exercise protocol. Stored samples were retrospectively used to measure plasma hepatic markers, i.e. steatosis-related alanine and aspartate transaminases, cytokeratin 18 and angiopoietin-like 3, at baseline, after 30 and 60 days of bed rest. Fasting insulin and triglycerides were measured at baseline and after 30 days of bed rest. Two indexes were calculated, one combining alanine and aspartate transaminase and cytokeratin 18 and another cytokeratin 18, homeostasis model assessment of insulin resistance and aspartate aminotransferase. **Results:** Sixty days of bed rest increased all hepatic markers ( $P < 0.05$  for all) and the two indexes ( $P < 0.01$  for both). Exercise significantly reduced the elevation in aspartate transaminase, cytokeratin 18 and both indexes ( $P < 0.02$  for all) but not the increase in alanine transaminase and angiopoietin-like 3. Changes between baseline and 30 days of bed rest in triglycerides were positively associated with changes in aspartate transaminase ( $R^2 = 0.28$ ,  $P = 0.04$ ) suggesting a role of hypertriglyceridaemia in the alteration of liver metabolism under inactive conditions. **Conclusion:** Physical inactivity increases, independent of fat mass, hepatic markers of steatosis and steatohepatitis. Regular exercise can limit these physical inactivity-induced metabolic alterations. Future studies need to elucidate the underlying mechanisms.

titis (NASH). Although the pathophysiology of NAFLD requires further elucidation, according to the 'two-hit' hypothesis (1), the development of hepatic steatosis associated with insulin resistance and alteration of lipid oxidation (2) is followed by a phase of inflammation and oxidative stress leading to activation of stellate cells, increased collagen deposition

**Key points box:**

- Steatohepatitis
- Transaminases, cytokeratin 18 (CK18) and angiotensin-like 3 (ANGPTL3)
- Physical inactivity
- Exercise

and fibrosis (3). Worldwide prevalence is estimated between 2.8% and 46% in the adult population and up to 90% in overweight and obese individuals (4, 5). Common explanation for the increased prevalence of NAFLD is the increased rate of obesity. The risk of developing NAFLD, however, is not limited to overweight individuals. A better understanding of its determinants is needed.

Beside obesity, low levels of exercise are thought to represent a major risk factor of developing metabolic syndrome (6). Recent epidemiological data even showed that time spent in sedentary activities has a harmful effect independent of the time spent exercising on insulin sensitivity and a number of cardio-metabolic biomarkers (7). The effects of physical activity and sedentary behaviours may extend to NAFLD. Cross-sectional population studies observed a negative association between time spent in leisure activity and NAFLD prevalence (8) and in old adults between intrahepatic fat and physical activity level (9, 10). A 3-month low-to-moderate intensity exercise training has also been shown to improve, independent of weight loss, liver enzymes and insulin sensitivity in patients with NAFLD (11). Longitudinal investigations to directly examine the impact of physical inactivity on liver metabolism are, however, missing.

By using plasma samples collected during a previous 60-day bed-rest study in healthy female adults under stable energy balance conditions, we retrospectively assessed whether enforced physical inactivity affects markers of hepatic steatosis and NAFLD. Bed-rest studies are validated models of simulated weightlessness during which countermeasures are tested to prevent and/or decrease the adaptations to the physical deconditioning occurring during space flights. In this study, we tested, concomitantly to bed rest, the impact of a combined aerobic and resistive exercise protocol as countermeasure. We specifically examined changes in plasma concentrations of four hepatic markers known to be associated with steatosis, steatohepatitis or NAFLD-related metabolic features, i.e. the two liver enzymes alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST), fragments of cytokeratin 18 (CK18), a marker of hepatic apoptosis considered a good predictor of steatohepatitis (12, 13), and angiotensin-like 3 (ANGPTL3), a liver derived plasma protein that modulates plasma trigly-

cerides clearance (14) and is increased in more severe stage of NASH (15).

**Methods****Study design**

Details of the study can be found elsewhere (16, 17). Briefly, 16 healthy normal-weight women participated in a 60-day bed rest study. This study was divided into three periods: a 20-day baseline period, a 60-day bed rest, and a 20-day recovery period. Subjects were randomized into two groups ( $n = 8$ , each): a control group subjected to strict bed rest and an exercise group that was subjected to supine resistive and aerobic exercise training protocol concomitantly to bed rest. Nineteen resistive training sessions of 35-min were performed every 3-day at maximal effort on a flywheel ergometer. Aerobic training was performed three to four times per week (29 sessions of  $50 \pm 2$  min on average), with intensities varying from 40 to 80% pre-bed rest maximal oxygen uptake. Dietary intake was tightly controlled by dietitians during the whole period of the study to maintain subjects in energy balance. No alcohol consumption was allowed. Every subject signed a written informed consent form. The protocol was approved by the Midi-Pyrénées I Institutional Review Board.

**Body composition**

Body mass (BM), fat mass (FM) and fat free mass (FFM) were measured before and after 30 (BR30) and 60 days of bed rest (BR60) by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA, Hologic, France).

**Metabolic and hepatic markers measurements**

At baseline and BR30, dietary fat metabolism was fully investigated (17). Fasting plasma insulin was measured by radioimmunoassay (DSL, Webster, TX, USA) and glucose and triglycerides by enzymatic methods (Biomérieux, Lyon, France).

From stored fasting plasma samples, we measured hepatic markers concentration at baseline, BR30 and BR60. Plasma ALT and AST were measured by enzymatic test using phosphate pyridoxal, as routinely done in hospital laboratories. Plasma ANGPTL3 and fragments of CK18 were, respectively, assessed by using Quantikine Human Angiotensin-like 3 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) and M30 Apoptosense (Peviva, Stockholm, Sweden) Elisa kits. Plasma leftovers were insufficient to measure fasting triglycerides and insulin at BR60.

We considered two combined indexes of NAFLD, the AAC index (an acronym for AST, ALT and CK18) calculated as the sum of reduced values (according to base-

line values) of AST, ALT and CK18 and the CHA index [an acronym for CK18, homoeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), AST Index] calculated as the product of HOMA-IR, AST and CK18 (divided by 1000) (18). While we calculated the AAC index at both BR30 and BR60, the CHA index was obtained at BR30 only since fasting insulin was not measured at BR60.

### Statistical analysis

Data are presented as mean  $\pm$  SD. Analyses were performed with SAS software (SAS v.9.3., Institute Inc., Cary, NC, USA). Significance was set up to 0.05. Between-group comparisons at baseline were performed by using Student's *t*-tests. The evolution of anthropometric and biological variables was analysed by using mixed linear models taking into account the repeated measures over time with individuals as random effects and baseline values of the dependent variable as fixed effect. Models considering biological variables were adjusted for FM. Prespecified hypotheses were that bed rest will induce a significant increase in insulin, triglycerides and hepatic markers concentrations and that the exercise countermeasure will significantly reduce the effect of bed rest on the metabolic and hepatic markers leading to non-significant variations over time. One-tailed tests were used

for these analyses. The associations between changes in hepatic markers concentrations and changes in anthropometric (FM) and metabolic (insulin, HOMA-IR, triglycerides) variables were tested by using Pearson correlations.

## Results

### Body composition and metabolic variables

No between-groups differences were noted at baseline (Table 1). After 60 days of bed rest, BM had decreased in both groups by 6% on average ( $P < 0.001$ ). In the control group, BM reduction was mainly related to a loss of FFM ( $-7\%$ ;  $P < 0.001$ ). In the exercise group, weight loss was because of reduction in both FFM ( $-3\%$ ;  $P = 0.001$ ) and FM ( $-14\%$ ;  $P = 0.001$ ). Compared to the control group, exercise nevertheless limited the loss of muscle ( $P < 0.001$ ).

Bed rest significantly increased fasting insulin and HOMA-IR at BR30 in the control group ( $+36\%$  and  $+49\%$  respectively;  $P < 0.01$  for both). These increases were significantly lower in the exercise group compared to the control group ( $+17\%$  and  $+18\%$ ;  $P = 0.02$  and  $P < 0.01$  respectively) and no more significant. Fasting triglycerides, however, increased by 35% on average from baseline to BR30 in both the control and exercise groups ( $P = 0.03$  for both).

**Table 1.** Anthropometry, metabolic characteristics and hepatic markers according to groups and time

Characteristics	Control ( <i>n</i> = 8)			Exercise ( <i>n</i> = 8)		
	Baseline	BR30	BR60	Baseline	BR30	BR60
<b>Body composition</b>						
Age (years)	34.0 $\pm$ 1.4					
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.0 $\pm$ 0.5	20.0 $\pm$ 0.5	19.7 $\pm$ 0.4	21.4 $\pm$ 0.6	20.6 $\pm$ 0.5	20.2 $\pm$ 0.5
BM (kg)	55.6 $\pm$ 3.9	52.9 $\pm$ 4.1 <sup>c</sup>	52.3 $\pm$ 3.8 <sup>c</sup>	58.1 $\pm$ 6.4	55.8 $\pm$ 6.0 <sup>c,d</sup>	54.9 $\pm$ 6.1 <sup>c</sup>
FM (kg)	14.7 $\pm$ 3.8	14.7 $\pm$ 3.8	14.3 $\pm$ 3.5	14.3 $\pm$ 3.1	13.1 $\pm$ 3.5 <sup>c,f</sup>	12.4 $\pm$ 3.6 <sup>c,f</sup>
FFM (kg)	40.9 $\pm$ 3.1	38.3 $\pm$ 3.2 <sup>c</sup>	38.0 $\pm$ 3.0 <sup>c</sup>	43.8 $\pm$ 5.7	42.7 $\pm$ 5.5 <sup>c,f</sup>	42.5 $\pm$ 5.7 <sup>c,f</sup>
<b>Metabolic parameters</b>						
Insulin (mIU/l)	4.7 $\pm$ 1.4	6.2 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>	–	4.3 $\pm$ 1.3	4.7 $\pm$ 0.9 <sup>d</sup>	–
HOMA-IR	0.97 $\pm$ 0.30	1.41 $\pm$ 0.51 <sup>b</sup>	–	0.86 $\pm$ 0.26	0.97 $\pm$ 0.18 <sup>e</sup>	–
Triglycerides (g/L)	0.68 $\pm$ 0.21	0.94 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	–	0.65 $\pm$ 0.12	0.88 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	–
<b>Hepatic biomarkers</b>						
AST (IU/L)	18.8 $\pm$ 4.7	24.0 $\pm$ 6.1 <sup>b</sup>	24.3 $\pm$ 5.8 <sup>b</sup>	15.9 $\pm$ 2.8	19.0 $\pm$ 4.0	17.8 $\pm$ 3.2 <sup>d</sup>
ALT (IU/L)	13.5 $\pm$ 5.3	25.3 $\pm$ 11.5 <sup>c</sup>	22.8 $\pm$ 9.4 <sup>b</sup>	13.4 $\pm$ 4.6	18.6 $\pm$ 7.8 <sup>d</sup>	18.3 $\pm$ 6.7
CK18 (U/L)	122.3 $\pm$ 44.5	161.6 $\pm$ 71.6	194.2 $\pm$ 95.4 <sup>b</sup>	126.1 $\pm$ 35.7	117.1 $\pm$ 7.6 <sup>d</sup>	139.5 $\pm$ 18.7 <sup>d</sup>
ANGPTL3 (ng/ml)	70.2 $\pm$ 11.6	76.2 $\pm$ 10.1	85.8 $\pm$ 24.8 <sup>a</sup>	68.6 $\pm$ 13.1	75.9 $\pm$ 18.4	75.2 $\pm$ 13.6
CHA	2.2 $\pm$ 1.3	5.3 $\pm$ 2.6 <sup>b</sup>	–	1.7 $\pm$ 0.7	2.1 $\pm$ 0.4 <sup>d</sup>	–
AAC	10.6 $\pm$ 2.5	15.4 $\pm$ 3.9 <sup>c</sup>	15.7 $\pm$ 3.3 <sup>c</sup>	10.0 $\pm$ 1.7	11.6 $\pm$ 2.4 <sup>e</sup>	11.8 $\pm$ 2.1 <sup>e</sup>

AAC (Alanine transaminase, Aspartate transaminase, Cytokeratin 18 index); ALT, alanine transaminase; ANGPTL3, angiotensin-like protein 3; AST, aspartate transaminase; BM, body mass; BMI, body mass index; BR30, after 30 days of bed rest; BR60, after 60 days of bed rest; CHA (Cytokeratin 18, homoeostasis model assessment of insulin resistance, Aspartate transaminase index); CK18, cytokeratin 18; FFM, fat free mass; FM, fat mass; HOMA-IR, homoeostasis model assessment of insulin resistance.

Data are presented as mean  $\pm$  SD. Analyses were done using linear mixed models taking into account repeated measures, with adjustment for baseline values and for FM for hepatic biomarkers.

<sup>a</sup> $P \leq 0.05$ , <sup>b</sup> $P \leq 0.01$  and <sup>c</sup> $P \leq 0.001$  vs baseline; <sup>d</sup> $P \leq 0.05$ , <sup>e</sup> $P \leq 0.01$  and <sup>f</sup> $P \leq 0.001$  vs control group variations.

### Hepatic markers of NAFLD

At baseline, no significant difference in hepatic markers was noted between the two groups (Table 1). In the control group, 30 days of bed rest induced a significant increase in the transaminases (AST: +28%,  $P < 0.01$  and ALT: +87%,  $P < 0.001$ ) that was maintained at BR60 (AST: +32% and ALT: +75%;  $P < 0.01$  for both). While no significant modifications were noted at BR30, both CK18 (+76%;  $P < 0.01$ ) and ANGPTL3 (+29%;  $P = 0.02$ ) were significantly higher after 2 months of bed rest than at baseline. In the exercise group the increases at BR60 in AST (+13%) and CK18 (+22%), but not in ALT (+37%) and ANGPTL3 (+10%), were significantly reduced compared to the control group ( $P = 0.02$  for both). These increases did not reach significance for any of the hepatic markers.

Hepatic index AAC increased by 51% ( $P < 0.001$ ) after 30 days of bed rest; this elevation was maintained for the next 30 days (+52%,  $P < 0.001$ ) (Fig. 1). Hepatic index CHA was 162% higher at BR30 than at baseline ( $P < 0.001$ ). In the exercise group, no significant changes were noted and the increase in both AAC (+17% and +19% at BR30 and BR60 respectively) and CHA (+48% at BR30) were significantly lower than those measured in the control group ( $P < 0.01$  for all) and not significant.

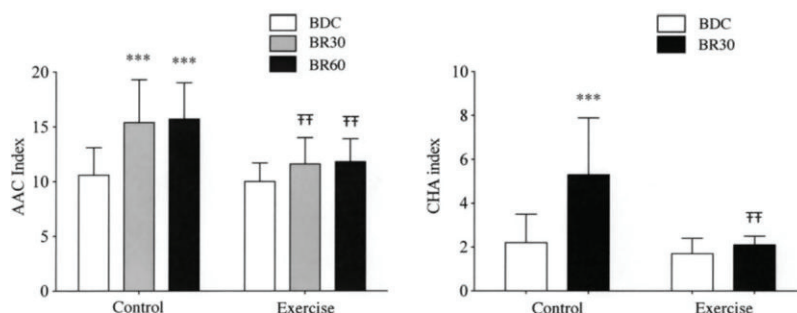
### Correlation analyses

Baseline-to-BR30 changes in AST were positively associated with concomitant changes in ALT both in the control ( $R^2 = 0.81$ ,  $P < 0.01$ ) and exercise group ( $R^2 = 0.64$ ,  $P = 0.02$ ). In the control group only, baseline-to-BR30 changes in fasting triglycerides were also positively associated with concomitant changes in AAC ( $R^2 = 0.66$ ,  $P = 0.02$ ), CHA ( $R^2 = 0.74$ ,  $P < 0.01$ ) and AST ( $R^2 = 0.44$ ,  $P = 0.07$ ). Changes in FM and insulin did not significantly correlate with any of the hepatic markers.

### Discussion

Although it is admitted that physical inactivity plays a key role in the development of metabolic diseases, its impact on liver metabolism and in the development of NAFLD are still poorly characterized. We retrospectively used samples from a previous 60-day bed rest study, taking thus advantage of a unique opportunity to follow the evolution of hepatic markers of several stages of NAFLD when transitioning from physically active status to severe physical inactivity. We furthermore investigated the protective effect of combined aerobic and resistive exercise on hepatic markers changes. In this study, we showed that, under controlled energy balance conditions, enforced physical inactivity increases hepatic markers that are associated with hepatic steatosis, steatohepatitis and even more severe stages of NAFLD. This supports the observation from cross-sectional studies of higher prevalence of NAFLD in sedentary normal-weight men than in their physically active counterparts (19). It is also consistent with rodents studies showing that transition from an active to sedentary state induces an increased risk of liver steatosis along with an accumulation of lipogenesis intermediates (20), a reduction in hepatic fat oxidation (20) and hypertriglyceridaemia, features associated with NAFLD (21).

Of note, after 2 months of bed rest, transaminases that were positively associated were still in a normal range of concentrations. This, however, does not diminish the impact of physical inactivity on liver metabolism. Similar elevated but normal concentrations are indeed observed in a large number of patients with NAFLD (22) and are associated with greater risks to develop metabolic disorders and diabetes (23). Furthermore, if elevated transaminases are widely used to detect the presence of NAFLD (24), they represent a poor predictor of NASH when used alone. That is why we combined them with measures of more specific steatohepatitis markers. Caspase-cleaved fragments of CK18, the major intermediate filament protein in the liver, are released in the blood stream following the



**Fig. 1.** Combined hepatic indices according to group and time. \*Data are presented as mean  $\pm$  SD. Analyses were done using mixed models taking into account repeated measures, with adjustment for baseline value and for FM. AAC (Alanine transaminase, Aspartate transaminase, Cytokeratin 18 index); BR30, after 30 days of bed rest; CHA (Cytokeratin 18, homeostasis model assessment of insulin resistance, Aspartate transaminase index). \*\*\* $P \leq 0.001$  vs baseline; <sup>††</sup> $P \leq 0.01$  vs concomitant control value.

apoptotic cell death of injured hepatocytes. Because liver apoptotic activity is associated with steatohepatitis, but not with isolated hepatic steatosis, levels of CK18 fragments can differentiate the two states of NAFLD (12). CK18 is recognized as the most promising single non-invasive biomarker of NASH by the guidelines for the diagnosis and management of NAFLD (25). We showed that enforced physical inactivity increases CK18, and this elevation even reached the 200 cut-off values proposed for the detection of NASH (26) in half of our control subjects. This, in addition to the augmentation of AAC index in the control subjects, suggests an onset of the development of NASH under physical inactivity conditions. However, the fact that the increase in ANGPTL3 was only moderate indicates that our volunteers did probably not reach more severe stages of NAFLD. The development of NAFLD could not be verified using invasive liver biopsies or non-invasive imaging of liver fat content, because the study was retrospective. Of note it is important to indicate that ectopic fat storage in those very same subjects were observed in both the bone marrow (27) and the skeletal muscle (17). This likely reflects a general response to bed rest and the present results on liver biomarkers do support the development of a fatty liver.

Because bed rest induced hypertriglyceridaemia and ANGPTL3 is a hepatic actor of lipid metabolism, an association between changes in plasma triglycerides and ANGPTL3 was expected. The reduced clearance of triglycerides may, however, be rather because of defects in fat uptake at muscle level rather than to an inhibition of hepatic lipoprotein lipase (LPL) by ANGPTL3 leading to a reduced fat uptake by liver. Previously reported results from this same bed rest study showed that physical inactivity decreases muscle gene expression of the fatty acid transporters into muscle and mitochondria, i.e. FAT/CD36 and CPT1, respectively, suggesting a reduced uptake of fatty acid by the muscle. This alteration was associated with a reduced muscle oxidative capacity and whole-body fat oxidation. Altogether these results support the hypothesis that hypertriglyceridaemia is the result of an altered clearance at muscle level. However, in the absence of direct measurements of muscle and liver LPL activity, it is difficult to conclude on the exact cause of hypertriglyceridaemia in our subjects. We, however, reported a positive correlation between AST and triglycerides, as it has been previously observed in obese patients (28), suggesting a role of ectopic fat storage in the alteration of liver metabolism under inactive conditions. It is finally important to note that not only the combined index including the hepatic markers increased during the bed rest period, but also CHA that considered insulin sensitivity in its calculation. Furthermore, changes in both NAFLD indexes, CHA and AAC, were positively associated with increased plasma triglycerides. Altogether

these results suggest relationships between insulin sensitivity, ectopic fat storage and liver metabolism under inactive conditions. As we recently reviewed it (29), enforced physical inactivity leads to the development of insulin resistance and hypertriglyceridaemia along with a reduced muscle fat uptake and oxidation. Understanding the underlying time course of these different metabolic alterations induced by physical inactivity and thus their cause-to-effect relationships will help gaining a better understanding on the mechanisms underlying the onset of hepatic diseases as well as on the role of sedentary behaviours in the risk of developing NAFLD and metabolic syndrome.

We further showed that training programme combining resistive and aerobic exercise prevents, at least in part, the increase in hepatic markers induced by physical inactivity. Previous studies showed that moderate-intensity aerobic exercise improves ALT concentration in patients with NAFLD (30) and decreases liver fat content (31) and inflammation (32). Both aerobic and resistive exercises, performed independently, improve intrahepatic fat (33, 34) and insulin sensitivity (33) even in absence of weight loss in obese adolescents. Consistent with our results, aerobic exercise training has also been shown to decrease CK18 in obese patients (35) and ANGPTL3 in patients with coronary artery disease (36). In our study, the increase in the hepatic markers was, however, limited but not fully prevented in the exercise group. These results are consistent with previous observations we had made on these same participants. In an in-depth investigation of the effect of physical inactivity on the intermediary metabolism (17), we had demonstrated that the combined aerobic/resistive exercise training prevented the development of insulin resistance induced by bed rest, but not the development of hypertriglyceridaemia, the reduced exogenous and total fatty acid oxidation, the decrease in fatty acid uptake by the muscle, the reduced oxidative capacity, and the accumulation of fat in skeletal muscle. Population studies have recently suggested that the deleterious effect of sedentary behaviours on metabolic health is independent of the practice of moderate-intensity exercise. This exercise-induced partial prevention of the negative effects induced by bed rest may be explained by the absence of light-intensity physical activity (e.g. walking, taking stairs or any body movement of daily life) in our bed-rested exerciser subjects. To better understand the independent role of sedentary behaviours and physical exercise countermeasure in the development of metabolic and hepatic abnormalities, further studies will be needed.

Some limitations have to be acknowledged. As previously evoked hepatic fat content measurements and liver biopsy are missing. Hepatic markers, and in particular CK18 (13, 37, 38), however, are considered good markers to evaluate the degree of hepatic impairments (39), especially when not limited to transaminases but



used as combined indexes like we did. The low number of subjects participating to this study can be seen as a limiting factor. However, this is a typical sample size for bed rests (17, 27, 40) and the design of any bed rest study undergoes thorough *a priori* power calculation for sample sizes on the principal outcomes. Finally, these results have been obtained in healthy lean female adult and will need to be extended to other populations (male, children, adolescents, elderly, overweight, etc.).

Hepatic markers of steatosis and steatohepatitis are impacted by severe physical inactivity, induced by 60 days of bed rest in healthy normal-weight women. Despite the absence of hepatic diseases, transaminases and markers of more severe stages like CK18 and ANGPTL3 increased independent of FM variation. Two NAFLD combined indexes (AAC and CHA), with one including insulin resistance index also worsened during this study. Our results are in accordance with the suggested role of physical inactivity in the development of metabolic diseases and more particularly NAFLD. In the second part of our study, we proposed a potential partial protective effect of aerobic and resistive exercise, by maintaining or limiting the increase in hepatic markers under severe physical inactivity. Complementary studies on healthy persons are still required to focus on an effective prevention against the development of NAFLD. Interesting studies suggest a combination of nutritional and physical countermeasures.

### Acknowledgements

The authors are indebted to the participants and the administrative and medical staff of the Institute of Space Medicine for their outstanding organization of the bed rest supported by CNES, ESA, NASA and CSA. We particularly thank the participants of this study.

**Financial support:** The global cost of the 60-day bed rest study was supported by the European, French, American and Canadian Space Agencies. This study was funded by grants from the Centre National d'Etudes Spatiales, the Centre National de la Recherche Française and the University of Strasbourg. AB and FR were both supported by Graduate scholarships from the Centre National des Etudes Spatiales.

**Conflict of interest:** The authors have nothing to disclose.

### References

- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; **114**: 842–5.
- Krawczyk M, Bonfrate L, Portincasa P. Nonalcoholic fatty liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010; **24**: 695–708.
- Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; **43**(2 Suppl. 1): 99–112.
- Pan JJ, Fallon MB. Gender and racial differences in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 2014; **6**: 274–83.
- Williams CD, Stengel J, Asike MI, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology* 2011; **140**: 124–31.
- Laaksonen DE, Lakka HM, Salonen JT, et al. Low levels of leisure-time physical activity and cardiorespiratory fitness predict development of the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2002; **25**: 1612–8.
- Healy GN, Dunstan DW, Salmon J, et al. Breaks in sedentary time: beneficial associations with metabolic risk. *Diabetes Care* 2008; **31**: 661–6.
- Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Goldsmith R, et al. Role of leisure-time physical activity in nonalcoholic fatty liver disease: a population-based study. *Hepatology* 2008; **48**: 1791–8.
- Perseghin G, Lattuada G, De Cobelli F, et al. Habitual physical activity is associated with intrahepatic fat content in humans. *Diabetes Care* 2007; **30**: 683–8.
- Hsieh SD, Yoshinaga H, Muto T, Sakurai Y. Regular physical activity and coronary risk factors in Japanese men. *Circulation* 1998; **97**: 661–5.
- George AS, Bauman A, Johnston A, Farrell G. Independent effects of physical activity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009; **50**: 68–76.
- Anty R, Iannelli A, Patouraux S, et al. A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; **32**: 1315–22.
- Yilmaz Y, Kedrah AE, Ozdogan O. Cytokeratin-18 fragments and biomarkers of the metabolic syndrome in non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2009; **15**: 4387–91.
- Li C. A tale of two angiopoietin-like proteins. *Curr Opin Lipidol* 2007; **18**: 597–9.
- Yilmaz Y, Ulukaya E, Atug O, Dolar E. Serum concentrations of human angiopoietin-like protein 3 in patients with nonalcoholic fatty liver disease: association with insulin resistance. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; **21**: 1247–51.
- Bergouignan A, Momken I, Schoeller DA, et al. Regulation of energy balance during long-term physical inactivity induced by bed rest with and without exercise training. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; **95**: 1045–53.
- Bergouignan A, Trudel G, Simon C, et al. Physical inactivity differentially alters dietary oleate and palmitate trafficking. *Diabetes* 2009; **58**: 367–76.
- Polyzos SA, Kountouras J, Papatheodorou A, et al. Adipocytokines and cytokeratin-18 in patients with nonalcoholic fatty liver disease: introduction of CHA index. *Ann Hepatol* 2013; **12**: 749–57.
- Rector RS, Thyfault JP. Does physical inactivity cause non-alcoholic fatty liver disease? *J Appl Physiol* 2011; **111**: 1828–35.
- Rector RS, Thyfault JP, Laye MJ. Cessation of daily exercise dramatically alters precursors of hepatic steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *J Physiol* 2008; **586**: 4241–9.
- Zderic TW, Hamilton MT. Physical inactivity amplifies the sensitivity of skeletal muscle to the lipid-induced

- downregulation of lipoprotein lipase activity. *J Appl Physiol* 2006; **100**: 249–57.
22. Burgert TS, Taksali SE, Dziura J, *et al.* Alanine aminotransferase levels and fatty liver in childhood obesity: associations with insulin resistance, adiponectin, and visceral fat. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; **91**: 4287–94.
  23. Preiss D, Sattar N. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. *Clin Sci* 2008; **115**: 141–50.
  24. Harrison SA, Oliver D, Arnold HL, Gogia S, Neuschwander-Tetri BA. Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease. *Gut* 2008; **57**: 1441–7.
  25. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, *et al.* The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 2012; **55**: 2005–23.
  26. Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, *et al.* Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for non-alcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology* 2009; **50**: 1072–8.
  27. Trudel G, Payne M, Madler B, *et al.* Bone marrow fat accumulation after 60 days of bed rest persisted 1 year after activities were resumed along with hemopoietic stimulation: the Women International Space Simulation for Exploration study. *J Appl Physiol* 2009; **107**: 540–8.
  28. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol* 2003; **98**: 960–7.
  29. Bergouignan A, Rudwill F, Simon C, Blanc S. Physical inactivity as the culprit of metabolic inflexibility: evidence from bed-rest studies. *J Appl Physiol* 2011; **111**: 1201–10.
  30. Hickman IJ, Jonsson JR, Prins JB, *et al.* Modest weight loss and physical activity in overweight patients with chronic liver disease results in sustained improvements in alanine aminotransferase, fasting insulin, and quality of life. *Gut* 2004; **53**: 413–9.
  31. Johnson NA, Sachinwalla T, Walton DW, *et al.* Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weight loss. *Hepatology* 2009; **50**: 1105–12.
  32. Keating SE, Hackett DA, George J, Johnson NA. Exercise and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2012; **57**: 157–66.
  33. Hallsworth K, Fattakhova G, Hollingsworth KG, *et al.* Resistance exercise reduces liver fat and its mediators in non-alcoholic fatty liver disease independent of weight loss. *Gut* 2011; **60**: 1278–83.
  34. van der Heijden GJ, Wang ZJ, Chu ZD, *et al.* A 12-week aerobic exercise program reduces hepatic fat accumulation and insulin resistance in obese Hispanic adolescents. *Obesity* 2010; **18**: 384–90.
  35. Fealy CE, Haus JM, Solomon TP, *et al.* Short-term exercise reduces markers of hepatocyte apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Appl Physiol* 2012; **113**: 1–6.
  36. Beck EB, Erbs S, Mobius-Winkler S, *et al.* Exercise training restores the endothelial response to vascular growth factors in patients with stable coronary artery disease. *Eur J Prev Cardiol* 2012; **19**: 412–8.
  37. Beaton MD. Current treatment options for nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Can J Gastroenterol* 2012; **26**: 353.
  38. Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, *et al.* In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2006; **44**: 27–33.
  39. Ratziu V, Massard J, Charlotte F, *et al.* Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol* 2006; **6**: 6.
  40. Biolo G, Agostini F, Simunic B, *et al.* Positive energy balance is associated with accelerated muscle atrophy and increased erythrocyte glutathione turnover during 5 wk of bed rest. *Am J Clin Nutr* 2008; **88**: 950–8.



## ARTICLE 2

Effects of training and detraining on adiponectin plasma concentrations and muscle sensitivity in lean and overweight men

**Effets de l'entraînement et du désentraînement sur les concentrations plasmatiques d'adiponectine et la sensibilité musculaire à l'adiponectine chez des hommes normo-pondérés et en surpoids.**

**Caroline Gastebois**, Clément Villars, Jocelyne Draï, Emmanuelle Canet-Soulas, Stéphane Blanc, Audrey Bergouignan, Etienne Lefai et Chantal Simon

Soumis : European Journal of Applied Physiology



## **Principaux résultats**

- Comme attendu dans la littérature, les **taux circulants d'adiponectine** sont **plus faibles** chez les sujets inactifs en **surpoids**, en comparaison avec les sujets inactifs **normo-pondérés**, mais ne sont pas différents de ceux de sujets normo-pondérés actifs.

- **Les taux circulants d'adiponectine** sont plus **faibles** chez des sujets **actifs** en comparaison à des sujets inactifs, en bonne santé et normo-pondérés, **indépendamment de leur composition corporelle**.

- En l'absence d'effets sur la masse grasse, un **entraînement aérobie** de 8 semaines induit une **diminution des concentrations plasmatiques d'adiponectine** chez des sujets inactifs (normo-pondérés et en surpoids), et à l'inverse un **désentraînement** induit une **augmentation** d'adiponectine circulante chez les sujets actifs (normo-pondérés).

- Les variations d'adiponectine circulante totale induites par les variations du niveau d'activité physique (entre les groupes et avec les interventions) sont expliquées par les **variations de l'adiponectine de haut poids moléculaire**, mais ne sont pas expliquées par des variations d'expression de l'adiponectine dans le tissu adipeux ou musculaire.

- **L'adiponectine circulante** totale et de haut poids moléculaire sont **inversement** corrélées avec la **capacité cardiorespiratoire** et **positivement** avec **l'insulinémie à jeun**.

- La relation inverse entre l'insulinémie plasmatique à jeun et les récepteurs de l'adiponectine, et un de ses effecteurs, l'APPL1, dans le muscle supportent l'hypothèse d'une **amélioration de la sensibilité à l'adiponectine musculaire avec l'augmentation du niveau d'activité physique**.

- Les résultats de cette étude indiquent qu'en l'absence d'effet sur le poids ou la masse grasse, le **niveau d'activité physique** et la **capacité cardiorespiratoire** sont **associés négativement** avec les concentrations plasmatiques d'**adiponectine**,

suggérant un lien possible avec **l'augmentation de la sensibilité musculaire à l'adiponectine**. Cette dernière pourrait contribuer aux effets bénéfiques de l'activité physique sur le muscle.

1 **Effects of training and detraining on adiponectin plasma concentration and**  
2 **muscle sensitivity in lean and overweight men**

3

4 Caroline Gastebois<sup>1</sup>, Clément Villars<sup>1</sup>, Jocelyne Draï<sup>1,2</sup>, Emmanuelle Canet-Soulas<sup>1</sup>, Stéphane Blanc<sup>3</sup>,  
5 Audrey Bergouignan<sup>4</sup>, Etienne Lefai<sup>1</sup>, Chantal Simon<sup>1</sup>

6

7 <sup>1</sup>CARMEN, INSERM U1060, University of Lyon 1, INRA1235, CRNH-RA, 69600 Oullins, France

8 <sup>2</sup>Laboratory of Biochemistry, Hospices Civils de Lyon, 69600 Oullins, France

9 <sup>3</sup>IPHC CNRS, UMR 7178, University of Strasbourg, 67087 Strasbourg, France

10 <sup>4</sup>Anschutz Health and Wellness Center, Division of Endocrinology, Metabolism and Diabetes, University of  
11 Colorado, Anschutz Medical Campus, Aurora, CO, USA

12

13 **Running head:** Effect of physical activity on plasma adiponectin

14 **Corresponding author and person to whom reprint requests should be addressed:**

15 Chantal Simon

16 Service d'Endocrinologie, Diabète, Nutrition

17 Centre Hospitalier Lyon Sud

18 165 Chemin du Grand Revoyet

19 F69310 PIERRE BENITE

20 Phone : 04 26 23 59 19

21 Fax : 04 72 67 88 64

22 E-mail: [chantal.simon@univ-lyon1.fr](mailto:chantal.simon@univ-lyon1.fr)

23

24 **Acknowledgments**

25 This study was supported by grants from: Fondation Cœur et Artères; University Hospital of  
26 Strasbourg, France; French National Agency for Research (PRNA); Centre National de la Recherche  
27 Scientifique (CNRS); French Ministry of Higher Education and Research through a fellowship (to



28 CG). Authors' contributions to manuscript: S.B. and C.S. conception and design of research; A.B.,  
29 S.B., C.S., E.L. and J.D. performed experiments; C.G., C.V., S.B. and C.S. analyzed data; C.G., and  
30 C.V. drafted manuscript; C.G., C.V., S.B., A.B., E.C.S. and C.S. edited and revised manuscript; C.G.,  
31 C.V., J.D., E.C.S., S.B., A.B., E.L., and C.S. approved final version of manuscript.

32

### 33 **CONFLICT OF INTEREST**

34 The authors declare that they have no conflict of interest.

35

36

37 **ABSTRACT**

38 **Purpose**

39 To delineate the effect of physical activity *per se* on adiponectin metabolism, we investigated the  
40 impact of contrasted physical activity changes, independent of body weight changes, on adiponectin  
41 plasma concentration and muscle sensitivity in lean and overweight healthy adult males.

42 **Methods**

43 Eleven physically active lean men ( $70.6 \pm 2.1$  kg) were subjected to one-month detraining; 9 sedentary  
44 lean men ( $73.1 \pm 3.3$  kg) and 11 sedentary overweight men ( $97.5 \pm 3.0$  kg) participated in a 2-month  
45 aerobic-exercise training program. Diet was controlled to maintain stable energy balance. Body  
46 composition,  $VO_{2peak}$ , circulating adiponectin, adipose and muscle tissue adiponectin, muscle  
47 adiponectin receptors and APPL1 mRNAs were measured before and after the interventions.

48 **Results**

49 At baseline plasma high-molecular-weight adiponectin concentration was lower in both active lean  
50 ( $5.44 \pm 0.58$   $\mu$ g/mL) and sedentary overweight ( $5.30 \pm 1.06$   $\mu$ g/mL) than in sedentary lean participants  
51 ( $7.44 \pm 1.06$   $\mu$ g/mL; both  $p < 0.05$ ). Training reduced total and high-molecular-weight adiponectin  
52 concentrations by respectively -32% and -42% in sedentary lean, -26% and -35% in sedentary  
53 overweight, while detraining increased them by +25% and +27% in active lean participants. Total and  
54 high-molecular-weight adiponectin changes were inversely correlated with  $VO_{2peak}$  changes  
55 (respectively,  $R^2 = 0.45$ ,  $R^2 = 0.59$ ; both  $p < 0.001$ ) and positively with changes in fasting plasma insulin  
56 (both  $p < 0.05$ ). Muscle and adipose tissue adiponectin mRNA did not differ between groups and with  
57 interventions. Muscle adiponectin receptors and APPL1 mRNAs were lower in sedentary groups compared to  
58 active group; and were associated positively with  $VO_{2peak}$  and inversely with fasting plasma insulin  
59 concentration.

60 **Conclusion**

61 Plasma adiponectin concentration is inversely correlated with aerobic capacity, which may be  
62 explained by changes in adiponectin sensitivity at muscle level.

63

#### 64 **KEY WORDS**

65 multimeric forms, adiponectin receptors, exercise, body weight, aerobic fitness

66

#### 67 **ABBREVIATIONS**

68 AMPK AMP-activated protein kinase

69 APPL1 Adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1

70 BMI Body mass index

71 ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay

72 FFM Fat free mass

73 FM Fat mass

74 HMW High molecular weight

75 LMW Low molecular weight

76 MMW Medium molecular weight

77 mRNA messenger ribonucleic acid

78 MOSPA Monica optional study of physical activity

79 SEM standard error of the mean

80  $VO_{2peak}$  maximal oxygen consumption

81

82

83 **INTRODUCTION**

84 About twenty years ago, adiponectin, which circulates in different multimeric forms (Schraw et al.  
85 2008), was identified as an adipocyte-derived secretory protein that is inversely expressed with obesity  
86 (Arita et al. 1999; Hu et al. 1996). Since then, adiponectin has been shown to have overall beneficial  
87 insulin-sensitizing, anti-inflammatory, anti-atherogenic and cardiovascular effects via signaling in  
88 various tissues including skeletal muscle and liver (Cheng et al. 2014; Ohashi et al. 2014). Because  
89 physical activity shares many of these beneficial effects on metabolic health (Bergouignan et al. 2011),  
90 a number of interventions were conducted to assess the impact of exercise on plasma adiponectin  
91 concentration. The results were, and are still, conflicting. While the majority of studies and a meta-  
92 analysis in diabetic subjects reported no effect (Hayashino et al. 2014), others showed either increase  
93 or decrease in plasma adiponectin concentration in response to various exercise protocols (Bouassida  
94 et al. 2010; Golbidi and Laher 2014; Simpson and Singh 2008). In addition to the specifics related to  
95 the studied populations, these divergent effects may be explained by a number of factors; the major  
96 one being the exercise-related changes in body and fat mass. Other factors may include (i) the type,  
97 intensity and duration of the physical exercise regimens, (ii) the various adiponectin forms measured  
98 in the plasma and (iii) our partial knowledge on muscle and adipose tissue metabolism of adiponectin.

99 The importance of these interrelated factors is illustrated by the few studies testing the respective or  
100 combined effects of diet and training interventions in obese subjects. Christiansen et al. (2010) showed  
101 that hypocaloric diet either used alone or in combination with training (both inducing about 13%  
102 weight loss) increases plasma adiponectin concentration. By contrast, endurance training without diet  
103 and inducing only a 3.5% weight loss did not modify plasma adiponectin concentration. Thus, the  
104 increasing effects of physical activity on adiponectin concentration observed in some studies, notably  
105 in obese patients (de Mello et al. 2011; de Piano et al. 2012), may be partly confounded by plasma  
106 adiponectin increase related to fat mass loss induced by the interventions.

107 On the other hand, a few studies reported reduction in plasma adiponectin concentration in response to  
108 exercise. Ibanez et al. (2010) showed that adiponectin concentration is reduced in obese women

109 subjected to a 16-week resistance exercise training combined with a diet program despite a 10%  
110 weight loss and improvement in insulin sensitivity. Endurance training in chronic heart failure patients  
111 also decreased adiponectin concentration while improving adiponectin sensitivity via its specific  
112 receptors in muscle cells and downstream AMPK effector (Van Berendoncks et al. 2011). In these  
113 patients, expression of muscle adiponectin receptor 1 (adipoR1) was found to be positively related to  
114 aerobic capacity. Although the exact mechanisms remain to be elucidated, other cellular effectors of  
115 the adiponectin cellular pathway, e.g. the endosomal adaptor protein (APPL1), was suggested to  
116 contribute to the improvement in adiponectin sensitivity in response to exercise in mice (Farias et al.  
117 2012; Marinho et al. 2012). APPL1 directly interacts with the intracellular regions of adiponectin  
118 receptors and has been shown to play a key function in adiponectin signalling. It has further been  
119 shown to regulate the metabolic effects of adiponectin, in particular adiponectin-dependent insulin  
120 sensitivity (Mao et al. 2006).

121 Taken together, these data suggest that part of the debate in the literature regarding the role of exercise  
122 on plasma adiponectin concentration is due to the confounding effect of exercise on body weight and  
123 composition. To better delineate the role of physical activity *per se* on adiponectin, we took advantage  
124 of the data and samples we collected during the LIPOX experiment (Bergouignan et al. 2013). LIPOX  
125 unique characteristic is to have successfully managed to clamp body weight and limit changes in body  
126 fat during contrasted interventions on the physical activity levels of overweight and lean participants.  
127 Active lean men were asked to become inactive for one month, and sedentary lean and obese men  
128 were engaged in an exercise training protocol at the current recommended level for 2 months. Here we  
129 retrospectively investigated the impact of these contrasted changes in physical activity level on 1)  
130 different circulating adiponectin forms 2) fat and muscle adiponectin gene expression, and 3) muscle  
131 adiponectin sensitivity signalling pathways i.e. adipoR1 and adipoR2 receptors, and APPL1 gene  
132 expression.

133

## 134 METHODS

### 135 *Participants and study protocol*

136 The protocol and main outcomes of LIPOX are detailed elsewhere (Bergouignan et al. 2013). Briefly,  
137 thirty-six men, free of any chronic known diseases and weight-stable for at least 3 months before  
138 enrolment were included in the study and divided into three groups, according to their body mass  
139 index and active/sedentary status: 1) 12 active lean men ( $20 \leq$  body mass index,  $\text{BMI} \leq 25 \text{ kg/m}^2$ ), 2)  
140 12 sedentary lean men ( $20 \leq \text{BMI} \leq 25 \text{ kg/m}^2$ ) and 3) 12 sedentary overweight men ( $27 \leq \text{BMI} \leq 35$   
141  $\text{kg/m}^2$ ). Participants were classified as sedentary or active based on the Monica Optional Study of  
142 Physical Activity (MOSPA) questionnaire (Roeykens et al. 1998). Sedentary participants reported no  
143 structured exercise program over the 12 months prior to the study and a null to low professional  
144 physical activity; active participants were involved in regular sportive moderate-to-vigorous aerobic  
145 activity ( $\geq 2\text{-}3$  h per week). Sedentary men were submitted to 2 months of training at the level of  
146 current recommendations, i.e. three 60-min supervised sessions per week at 50% of  $\text{VO}_{2\text{peak}}$  (maximal  
147 oxygen consumption) on a cycle ergometer. They were also asked to perform an additional 60-min  
148 aerobic weekend session, either cycling or running, with an intensity equivalent to that of the  
149 supervised training sessions, based on self-measured heart frequency. Active men were submitted to 1  
150 month of detraining, i.e. suspension of all structured physical activities and reduction in spontaneous  
151 activities of daily living. Compliance with the free-living components of the intervention was checked  
152 during weekly counselling with the participants and by using accelerometer data. Throughout the  
153 study, diet was regularly adjusted by a trained dietician in an effort to maintain participants in stable  
154 energy balance, based on an initial 3-day prospective food record, on weekly weighing and on food-  
155 recalls. Two sets of identical tests were performed before and after the interventions (Bergouignan et  
156 al. 2013). Fasting plasma samples were collected and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Biopsies of muscle and adipose  
157 tissues were performed at the end of the day during which participants ingested a standard breakfast  
158 and lunch.  $\text{VO}_{2\text{peak}}$  was determined on a separate day by using an incremental exercise test to  
159 exhaustion performed on a cycle ergometer. The study was approved by the Institutional Review  
160 Board of Alsace-1 and a signed informed consent was obtained from each participant. A total of five

161 participants have been excluded from this present analysis because of non-compliance to the protocol  
162 or missing blood samples for adiponectin measurements. Data presented here have been obtained in 11  
163 active lean, 9 sedentary lean and 11 sedentary overweight participants; for which we can perform pair-  
164 wise comparisons before versus after interventions.

165 Fat free mass (FFM) was calculated by hydrometry using deuterium and 18-oxygen dilution. A  
166 constant hydration factor of 0.73 was used to derive FFM from total body water (Bergouignan et al.  
167 2013). Fat mass (FM) was defined as the difference between body mass and FFM.

168 Fasting plasma adiponectin concentration was measured on -80° frozen plasma samples by ELISA  
169 using 3 different commercially available kits. Plasma concentration of total, high molecular weight  
170 (HMW), hexameric middle molecular weight (MMW), and trimeric low molecular weight (LMW)  
171 forms of adiponectin were first measured using one single ELISA kit, the multimeric adiponectin kit  
172 (Bühlmann Laboratories AG, Schoenenburg-Bale, Switzerland). This ELISA kit has an intra-assay  
173 variation coefficient (CV) of 5.4%, 4.2%, 12% and 10.2% for total, HMW, MMW and LMW forms of  
174 adiponectin, and an inter-assay CV ranging from 5 to 5.7%. Total adiponectin was then assessed by  
175 using the R&D Systems assay (R&D Systems Europe, Abingdon, UK) that has intra- and inter-assay  
176 CV of 3.5% and 6.5%, respectively. Lastly a Millipore assay (Millipore-Merck KGaA; Darmstadt;  
177 Germany) with intra- and inter-assay CV of 2.4% and 5.5% respectively, was used to further evaluate  
178 HMW adiponectin. Insulin was assessed by using immunoassay (ADVIA Centaur Insulin IRI  
179 Siemens, Dublin, Ireland).

180 Biopsies of *vastus lateralis* muscle were performed using a Bergström needle and adipose tissue  
181 biopsies obtained from needle liposuction. Muscle biopsies were available for 26 participants (9 active  
182 lean, 7 sedentary lean and 10 sedentary overweight) and adipose tissue biopsies for 23 participants (7  
183 active lean, 7 sedentary lean and 9 sedentary overweight). Total RNA was extracted using mirVana  
184 Isolation Kit (Life technologies, Saint Aubin, France) in both tissues. Gene expression levels of  
185 adiponectin, adipoR1 and adipoR2, APPL1 were measured in RNA isolation of muscle using real-time  
186 qPCR method. Adiponectin gene expression was further assessed in adipose tissue. Real-time qPCR

187 assays were performed using a Rotor-Gene™ 6000 (Qiagen, Courtaboeuf, France). Primers are  
188 available upon request ([Etienne.lefai@univ-lyon1.fr](mailto:Etienne.lefai@univ-lyon1.fr)).

### 189 ***Statistical analysis***

190 Data are presented as mean ± SEM. Analyses were done using mixed linear models, taking into  
191 account repeated individual data over time, with groups and interventions as fixed effects and  
192 individuals as random effect. Post-hoc Tukey tests were used to test baseline between-group  
193 differences and the effects of interventions in each group. Mixed models taking into account repeated  
194 measures when appropriate were also used to examine associations between given variables or their  
195 intervention-induced-changes, with R<sup>2</sup> measures calculated using a likelihood test (Kramer 2005).  
196 Analyses were done with SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Significance was set to 0.05.

## 197 **RESULTS**

### 198 ***Baseline characteristics of participants***

199 As illustrated in Table 1, overweight men had as expected significantly higher body weight, FFM, FM  
200 and BMI than both sedentary ( $p<0.01$ ) and active lean men ( $p<0.01$ ). Lean sedentary participants had  
201 also higher FM than their active counterparts ( $p<0.01$ ). Both sedentary groups exhibited lower VO<sub>2peak</sub>  
202 than the active group ( $p<0.01$  for both). Among sedentary groups, lean men had higher VO<sub>2peak</sub> than  
203 overweight men ( $p<0.01$ ). These latter also had higher plasma insulin concentration than both active  
204 and sedentary lean groups ( $p<0.01$  for both).

205 Table 2 and Figure 1 illustrate fasting plasma concentration of total adiponectin and of the different  
206 multimeric forms of adiponectin obtained from the different assays. Overall results were similar across  
207 the different assays that were used. At baseline, HMW but not total, LMW or MMW adiponectin  
208 concentrations were higher in the sedentary lean group as compared to both the active lean ( $p<0.05$ )  
209 and sedentary overweight groups ( $p<0.05$ ). Plasma HMW adiponectin concentration was lower in  
210 sedentary overweight than in sedentary lean participants, as expected from the differences in body fat



211 between these two groups. Despite lower FM and similar BMI, active lean participants also displayed  
212 lower HMW adiponectin than their sedentary counterparts.

213 To determine if differences in plasma adiponectin concentration between the groups were explained by  
214 differences in adiponectin tissue synthesis or uptake, gene expression of adiponectin and its receptors  
215 was examined (Table 2). Adiponectin mRNA expression was not significantly different between the  
216 groups neither in muscle nor in adipose tissue. Muscle gene expression of adipoR2 and of downstream  
217 effector APPL1 was lower in both the sedentary lean ( $p<0.05$  and  $p=0.07$ ; respectively) and sedentary  
218 overweight groups ( $p<0.001$  and  $p<0.01$ ; respectively) as compared to the active lean group. Muscle  
219 mRNA expression of adipoR1 was also lower in the sedentary overweight group as compared to the  
220 lean active group ( $p<0.01$ ).

#### 221 ***Effects of training in sedentary participants and detraining in active participants***

222 As designed, the interventions did not affect body mass of the participants. Body composition also  
223 remained stable except a moderate increase in FM ( $p<0.05$ ) and decrease in FFM ( $p<0.05$ ) in the  
224 detrained lean participants (Table 1). Training in sedentary men improved  $VO_{2peak}$  ( $p<0.01$ ) whereas  
225 detraining in active men induced opposite changes ( $p<0.01$ ). Changes in fasting plasma insulin  
226 concentration induced by the interventions did not reach significance.

227 Training significantly decreased both fasting total and HMW adiponectin concentrations in the  
228 sedentary groups by -25% and -20% respectively, whereas detraining significantly increased them by  
229 +23% and +25%, respectively (Figure 1). None of the interventions induced significant changes in  
230 MMW and LMW adiponectin concentrations (Table 2). Adipose tissue adiponectin and muscle  
231 adiponectin, adipoR1 and adipoR2 receptors and APPL1 gene expression were not significantly  
232 modified by the interventions (Table 2).

#### 233 ***Relationships between adiponectin, $VO_{2peak}$ , body composition and insulin***

234 Changes in plasma adiponectin concentration were not related to changes in body mass or FM.  
235 Changes in total and HMW - but not in MMW and LMW - adiponectin concentrations were

236 significantly and negatively associated with changes in  $VO_{2peak}$  (respectively  $R^2=0.45$ ,  $p<0.001$ ;  $R^2$   
237  $=0.59$ ,  $p<0.001$ ) induced by the physical activity interventions (Figure 2). These associations remained  
238 significant after adjustments for changes in body mass or body fat. A counter-intuitive positive  
239 relationship was observed between changes in plasma total and HMW adiponectin and fasting plasma  
240 insulin concentrations ( $p<0.05$  for both).

241 As illustrated in Figure 3, when considering both pre- and post-intervention data, muscle gene  
242 expression of both adiponectin receptors and APPL1 were positively correlated with  $VO_{2peak}$  (adipoR1:  
243  $p=0.05$ ; adipoR2:  $p<0.01$ ; APPL1:  $p=0.02$ ), but not with body mass, FFM or FM. There was also a  
244 significant inverse association between fasting insulin plasma concentration and muscle AdipoR1,  
245 adipoR2, and APPL1 gene expression ( $p<0.05$  for all).

## 246 **DISCUSSION**

247 Studies on the impact of long-term exercise training on adiponectin plasma concentration have  
248 reported highly variable results. Exercise was indeed shown to increase, decrease or not change  
249 circulating adiponectin concentration (Bouassida et al. 2010; Golbidi and Laher 2014; Hayashino et al.  
250 2014; Simpson and Singh 2008). In the present study, we examined the effect of changes in physical  
251 activity, induced by both training and detraining, on plasma adiponectin concentration in normal-  
252 weight and overweight male adults, independent of confounding effect of changes in both body and fat  
253 mass. Under these controlled conditions, we were able to show that plasma adiponectin concentration  
254 significantly decreases with physical training but increases with detraining, mainly due to variations in  
255 the multimeric HMW adiponectin form. This finding was strengthened by the observation that despite  
256 similar BMI and lower FM, active lean participants displayed lower HMW adiponectin than their  
257 sedentary counterparts; even if HMW adiponectin was, as expected, lower in sedentary overweight  
258 participants as compared to their sedentary lean counterparts.

259 Several studies attempted to establish a relationship between exercise and plasma adiponectin  
260 concentration and showed conflicting results with mostly no effect of chronic exercise as illustrated by  
261 a recent meta-analysis of randomized exercise trials in patients with type 2 diabetes (Hayashino et al.

262 2014). In line with our results and studies comparing exercise alone or combined with induced weight  
263 loss (Beavers et al. 2013; Christiansen et al. 2010), one can assume that fat mass variations associated  
264 with training counteract or override the decreasing effect of exercise *per se* leading to no change or  
265 even an increase in plasma adiponectin concentration. Furthermore adiponectin is unique in its post-  
266 translational modifications that result in different multimeric forms secreted in circulation, mainly a  
267 trimer LMW form, an hexamer MMW form and a 12-18 multimer HMW form (Schraw et al. 2008).  
268 This latter has been consistently reported as the most active form with a better association with insulin  
269 sensitivity than total adiponectin concentration (Hara et al. 2006). Studies investigating the effect of  
270 exercise on plasma adiponectin concentration did not systematically examine the same forms of  
271 adiponectin, which likely partly explains the discrepancy in the response observed to physical activity  
272 interventions. In the present study we measured different circulating adiponectin forms in response to  
273 both training and detraining. To be thorough in our approach, we confirmed our results by using  
274 different ELISA assays. Our results support past observations by showing that the variations in plasma  
275 adiponectin concentration induced by the interventions are mainly due to changes in HMW  
276 adiponectin concentration. HMW adiponectin was indeed the only form exhibiting significant  
277 between-group differences and changes in response to the interventions. Interestingly in a randomized  
278 study comparing the effects of endurance training-induced weight loss, diet-induced weight loss, and  
279 endurance-training without weight loss in moderately overweight men (Auerbach et al. 2013), while  
280 total adiponectin concentration did not vary in any of the intervention arms, there was a shift in the  
281 adiponectin multimer distribution in the trained groups. Independent of the amplitude of weight loss,  
282 endurance training was associated with a shift towards LMW adiponectin plasma concentrations with  
283 a 21% decrease in the HMW/LMW ratio.

284 The decrease in adiponectin in response to exercise, along with a decrease in fasting plasma insulin  
285 concentration, can appear counterintuitive given that adiponectin increases insulin sensitivity and fat  
286 oxidation, and is overall associated with positive health outcomes. Based on adipose tissue and muscle  
287 gene expression, variations in adiponectin synthesis rate are unlikely to explain our results. Similarly  
288 the very few studies that examined adiponectin gene expression in response to exercise intervention

289 showed either no variation or an increase that was concomitant to fat mass loss (Lee et al. 2011; Polak  
290 et al. 2006). In addition to adipocyte secretion, adiponectin clearance through peripheral uptake and  
291 adiponectin sensitivity are potential mechanisms contributing to changes in plasma adiponectin  
292 concentration and in the distribution of circulating adiponectin forms. In support of this, it has been  
293 shown that exercise affects plasma adiponectin clearance and enhances adiponectin uptake by  
294 oxidative tissues, presumably by improving blood flow and transendothelial transport of adiponectin  
295 complexes with a preferential effect on HMW (Rutkowski et al. 2014). On the other hand insulin-  
296 sensitizing action of exercise in diet-induced obese mice is, at least partly, explained by the increase in  
297 APPL1 (Mao et al. 2006; Marinho et al. 2012), adipoR1 and adipoR2 gene expression (Farias et al.  
298 2012; Marinho et al. 2012). Although we did not observe significant relationships with FFM, these  
299 increases may be partly explained by exercise-induced muscle mass changes. Interrelationships  
300 between muscle wet weight and AdipoR1, AdipoR2 and APPL1 mRNA or protein muscle levels have  
301 indeed been shown during unloading and reloading and functional overloading experiments in soleus  
302 muscle in mice (Goto et al. 2013). The inverse association in our study between fasting plasma insulin  
303 concentration and both adiponectin receptors and APPL1 mRNA further supports the existence of an  
304 improved adiponectin sensitivity with exercise. In humans, the underlying mechanisms regulating  
305 plasma adiponectin concentration have mostly been investigated in patients with chronic heart failure  
306 who present elevated plasma adiponectin concentration, a resistance to adiponectin at the skeletal  
307 muscle level and a very low cardiorespiratory capacity (Van Berendoncks et al. 2010). These  
308 metabolic characteristics have been associated with an increased risk of mortality (Wu et al. 2014). In  
309 muscle, these patients present decreased gene expression of adipoR1, which has been strongly  
310 associated with maximal exercise capacity (Van Berendoncks et al. 2011). Four months of combined  
311 endurance and resistance exercise training reduces circulating adiponectin concentrations and, above  
312 all, normalizes muscle expression of adipoR1 as well as the expression of related downstream genes  
313 (Van Berendoncks et al. 2011). Importantly we similarly found significant positive associations  
314 between adiponectin receptors, APPL1 and aerobic capacity ( $VO_{2peak}$ ). In line with our results, it has  
315 been shown that exercise alone or in combination with a diet enhances the mRNA expression of

316 adiponectin receptors in obese subjects, while a hypocaloric diet-induced weight-loss without exercise  
317 has no effect (Christiansen et al. 2010). Altogether these data suggest that muscle metabolism and  
318 effectors of adiponectin do converge with aerobic capacity and metabolic health. The decreased  
319 plasma adiponectin concentration we observed in response to training and training status may thus  
320 likely reflect increased HMW adiponectin clearance and adiponectin sensitivity in skeletal muscle,  
321 though this clearly requires additional molecular studies.

322 In conclusion, this study supports the importance of investigating the effect of physical activity on  
323 plasma adiponectin concentration independent of detectable changes in body composition. By doing  
324 so, we showed that physical training decreases both total and HMW circulating adiponectin.  
325 Association analyses further suggest that the lower plasma concentration may be associated with  
326 improved adiponectin sensitivity at the muscle level. This however requires additional confirmatory  
327 cellular studies.

## REFERENCES

- 328 Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T,  
329 Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M,  
330 Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific  
331 protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and biophysical research communications* 257  
332 (1):79-83. doi:10.1006/bbrc.1999.0255
- 333 Auerbach P, Nordby P, Bendtsen LQ, Mehlsen JL, Basnet SK, Vestergaard H, Ploug T, Stallknecht B  
334 (2013) Differential effects of endurance training and weight loss on plasma adiponectin  
335 multimers and adipose tissue macrophages in younger, moderately overweight men.  
336 *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 305  
337 (5):R490-498. doi:10.1152/ajpregu.00575.2012
- 338 Beavers KM, Ambrosius WT, Nicklas BJ, Rejeski WJ (2013) Independent and combined effects of  
339 physical activity and weight loss on inflammatory biomarkers in overweight and obese older  
340 adults. *Journal of the American Geriatrics Society* 61 (7):1089-1094. doi:10.1111/jgs.12321
- 341 Bergouignan A, Momken I, Lefai E, Antoun E, Schoeller DA, Platat C, Chery I, Zahariev A, Vidal H,  
342 Gabert L, Normand S, Freyssenet D, Laville M, Simon C, Blanc S (2013) Activity energy  
343 expenditure is a major determinant of dietary fat oxidation and trafficking, but the  
344 deleterious effect of detraining is more marked than the beneficial effect of training at  
345 current recommendations. *Am J Clin Nutr* 98 (3):648-658. doi: 10.3945/ajcn.3112.057075.  
346 Epub 052013 Jul 057031.
- 347 Bergouignan A, Rudwill F, Simon\* C, Blanc\* S, \*Co-Last-Authors (2011) Physical inactivity as the  
348 culprit of metabolic inflexibility: evidence from bed-rest studies. *Journal of applied  
349 physiology* 111 (4):1201-1210. doi:10.1152/jappphysiol.00698.2011
- 350 Bouassida A, Chamari K, Zaouali M, Feki Y, Zbidi A, Tabka Z (2010) Review on leptin and adiponectin  
351 responses and adaptations to acute and chronic exercise. *British journal of sports medicine*  
352 44 (9):620-630. doi:10.1136/bjism.2008.046151
- 353 Cheng KK, Lam KS, Wang B, Xu A (2014) Signaling mechanisms underlying the insulin-sensitizing  
354 effects of adiponectin. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 28  
355 (1):3-13. doi:10.1016/j.beem.2013.06.006
- 356 Christiansen T, Paulsen SK, Bruun JM, Ploug T, Pedersen SB, Richelsen B (2010) Diet-induced weight  
357 loss and exercise alone and in combination enhance the expression of adiponectin receptors  
358 in adipose tissue and skeletal muscle, but only diet-induced weight loss enhanced circulating  
359 adiponectin. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95 (2):911-919.  
360 doi:10.1210/jc.2008-2505
- 361 de Mello MT, de Piano A, Carnier J, Sanches Pde L, Correa FA, Tock L, Ernandes RM, Tufik S, Damaso  
362 AR (2011) Long-term effects of aerobic plus resistance training on the metabolic syndrome  
363 and adiponectinemia in obese adolescents. *Journal of clinical hypertension* 13 (5):343-350.  
364 doi:10.1111/j.1751-7176.2010.00388.x
- 365 de Piano A, de Mello MT, Sanches Pde L, da Silva PL, Campos RM, Carnier J, Corgosinho F, Foschini D,  
366 Masquio DL, Tock L, Oyama LM, do Nascimento CM, Tufik S, Damaso AR (2012) Long-term  
367 effects of aerobic plus resistance training on the adipokines and neuropeptides in  
368 nonalcoholic fatty liver disease obese adolescents. *European journal of gastroenterology &  
369 hepatology* 24 (11):1313-1324. doi:10.1097/MEG.0b013e32835793ac
- 370 Farias JM, Maggi RM, Tromm CB, Silva LA, Luciano TF, Marques SO, Lira FS, de Souza CT, Pinho RA  
371 (2012) Exercise training performed simultaneously to a high-fat diet reduces the degree of

372 insulin resistance and improves adipoR1-2/APPL1 protein levels in mice. *Lipids in health and*  
373 *disease* 11:134. doi:10.1186/1476-511X-11-134

374 Golbidi S, Laher I (2014) Exercise induced adipokine changes and the metabolic syndrome. *Journal of*  
375 *diabetes research* 2014:726861. doi:10.1155/2014/726861

376 Goto A, Ohno Y, Ikuta A, Suzuki M, Ohira T, Egawa T, Sugiura T, Yoshioka T, Ohira Y, Goto K (2013)  
377 Up-regulation of adiponectin expression in antigravitational soleus muscle in response to  
378 unloading followed by reloading, and functional overloading in mice. *PloS one* 8 (12):e81929.  
379 doi:10.1371/journal.pone.0081929

380 Hara K, Horikoshi M, Yamauchi T, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Imai Y, Nagai R, Kadowaki T (2006)  
381 Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the  
382 prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. *Diabetes Care* 29 (6):1357-1362.

383 Hayashino Y, Jackson JL, Hirata T, Fukumori N, Nakamura F, Fukuhara S, Tsujii S, Ishii H (2014) Effects  
384 of exercise on C-reactive protein, inflammatory cytokine and adipokine in patients with type  
385 2 diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Metabolism: clinical and*  
386 *experimental* 63 (3):431-440. doi:10.1016/j.metabol.2013.08.018

387 Hu E, Liang P, Spiegelman BM (1996) AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity.  
388 *J Biol Chem* 271 (18):10697-10703

389 Ibanez J, Izquierdo M, Martinez-Labari C, Ortega F, Grijalba A, Forga L, Idoate F, Garcia-Unciti M,  
390 Fernandez-Real JM, Gorostiaga EM (2010) Resistance training improves cardiovascular risk  
391 factors in obese women despite a significant decrease in serum adiponectin levels. *Obesity*  
392 18 (3):535-541. doi:10.1038/oby.2009.277

393 Kramer M (2005) R2 Statistics for Mixed Models. Presented at the 17th Annual Kansas State  
394 University Conference on Applied Statistics in Agriculture. April 24–26.

395 Lee S, Park Y, Dellsperger KC, Zhang C (2011) Exercise training improves endothelial function via  
396 adiponectin-dependent and independent pathways in type 2 diabetic mice. *American journal*  
397 *of physiology Heart and circulatory physiology* 301 (2):H306-314.  
398 doi:10.1152/ajpheart.01306.2010

399 Mao X, Kikani CK, Riojas RA, Langlais P, Wang L, Ramos FJ, Fang Q, Christ-Roberts CY, Hong JY, Kim RY,  
400 Liu F, Dong LQ (2006) APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin  
401 signalling and function. *Nature cell biology* 8 (5):516-523. doi:10.1038/ncb1404

402 Marinho R, Ropelle ER, Cintra DE, De Souza CT, Da Silva AS, Bertoli FC, Colantonio E, D'Almeida V,  
403 Pauli JR (2012) Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin  
404 signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss.  
405 *Journal of cellular physiology* 227 (7):2917-2926. doi:10.1002/jcp.23037

406 Ohashi K, Shibata R, Murohara T, Ouchi N (2014) Role of anti-inflammatory adipokines in obesity-  
407 related diseases. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 25 (7):348-355.  
408 doi:10.1016/j.tem.2014.03.009

409 Polak J, Klimcakova E, Moro C, Viguerie N, Berlan M, Hejnova J, Richterova B, Kraus I, Langin D, Stich  
410 V (2006) Effect of aerobic training on plasma levels and subcutaneous abdominal adipose  
411 tissue gene expression of adiponectin, leptin, interleukin 6, and tumor necrosis factor alpha  
412 in obese women. *Metabolism: clinical and experimental* 55 (10):1375-1381.  
413 doi:10.1016/j.metabol.2006.06.008

414 Roeykens J, Rogers R, Meeusen R, Magnus L, Borms J, de Meirleir K (1998) Validity and reliability in a  
415 Flemish population of the WHO-MONICA Optional Study of Physical Activity Questionnaire.  
416 *Med Sci Sports Exerc* 30 (7):1071-1075

- 417 Rutkowski JM, Halberg N, Wang QA, Holland WL, Xia JY, Scherer PE (2014) Differential  
418 transendothelial transport of adiponectin complexes. *Cardiovascular diabetology* 13:47.  
419 doi:10.1186/1475-2840-13-47
- 420 Schraw T, Wang ZV, Halberg N, Hawkins M, Scherer PE (2008) Plasma adiponectin complexes have  
421 distinct biochemical characteristics. *Endocrinology* 149 (5):2270-2282. doi:10.1210/en.2007-  
422 1561
- 423 Simpson KA, Singh MA (2008) Effects of exercise on adiponectin: a systematic review. *Obesity* 16  
424 (2):241-256. doi:10.1038/oby.2007.53
- 425 Van Berendoncks AM, Garnier A, Beckers P, Hoymans VY, Possemiers N, Fortin D, Martinet W, Van  
426 Hoof V, Vrints CJ, Ventura-Clapier R, Conraads VM (2010) Functional adiponectin resistance  
427 at the level of the skeletal muscle in mild to moderate chronic heart failure. *Circulation Heart  
428 failure* 3 (2):185-194. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.885525
- 429 Van Berendoncks AM, Garnier A, Beckers P, Hoymans VY, Possemiers N, Fortin D, Van Hoof V,  
430 Dewilde S, Vrints CJ, Ventura-Clapier R, Conraads VM (2011) Exercise training reverses  
431 adiponectin resistance in skeletal muscle of patients with chronic heart failure. *Heart* 97  
432 (17):1403-1409. doi:10.1136/hrt.2011.226373
- 433 Wu ZJ, Cheng YJ, Gu WJ, Aung LH (2014) Adiponectin is associated with increased mortality in  
434 patients with already established cardiovascular disease: a systematic review and meta-  
435 analysis. *Metabolism: clinical and experimental* 63 (9):1157-1166.  
436 doi:10.1016/j.metabol.2014.05.001
- 437



## TABLES

**Table 1.** Characteristics of the participants before and after the interventions on physical activity<sup>1</sup>

Variables	Active lean men		Sedentary lean men		Sedentary overweight men	
	Baseline	Detraining	Baseline	Training	Baseline	Training
	n=11	n=11	n=9	n=9	n=11	n=11
Age (years)	24.3±1.2		27.0±2.2		29.7±4.2	
BW (kg)	70.6±2.1	70.3±2.3	73.1±3.3	73.1±3.3	97.5±3.0‡§	97.6±3.2
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.2±0.5	22.1±0.5	22.2±0.6	22.2±0.6	29.9±0.5‡§	29.9±0.5
FFM (kg)	60.0±1.9	58.9±1.9*	58.0±2.5	58.2±2.4	66.6±2.0‡§	67.1±2.2
FM (kg)	10.6±1.1	11.3±1.3*	15.3±1.9‡	15.2±1.8	31.0±1.6‡§	30.5±1.6
FM (%)	14.9±1.4	16.0±1.6*	20.5±1.7‡	20.3±1.6	31.6±1.1‡§	31.1±1.1
VO <sub>2 peak</sub> (ml.min <sup>-1</sup> .kg <sup>-1</sup> )	49.0±1.6	45.8±1.3†	39.9±1.4‡	45.5±2.0†	31.0±1.4‡§	33.3±1.4†
Fasting insulin (ng.ml <sup>-1</sup> )	4.2±0.46	5.8±0.79	5.7±0.74	4.5±0.49	11.2±1.30‡§	10.6±1.45

<sup>1</sup> Abbreviations: BMI, body mass index; BW, body weight; FFM, fat-free mass; FM, fat mass; VO<sub>2peak</sub>, peak oxygen uptake. All values are means ± SEMs. \*  $p < 0.05$  compared with baseline, †  $p < 0.01$  compared with baseline; ‡  $p < 0.01$  compared with active lean men at baseline, §  $p < 0.01$  compared with sedentary lean men at baseline.

**Table 2. Plasma adiponectin concentration and tissue mRNA expression<sup>1</sup>**

	Active lean men		Sedentary lean men		Sedentary overweight men	
	Baseline	Detraining	Baseline	Detraining	Baseline	Detraining
	n=11	n=11	n=9	n=9	n=11	n=11
<b>Adiponectin</b>						
Total R&D System (µg/mL)	5.44±0.58	6.78±0.93*	7.44±1.06	5.08±0.62*	5.30±1.06	3.92±0.77*
Total Bühlmann (µg/mL)	3.80±0.33	4.30±0.43*	4.27±0.55	3.40±0.36	3.14±0.38	2.77±0.32
HWM Millipore (µg/mL)	2.44±0.38	3.10±0.46†	4.20±0.64‡	2.43±0.49*	2.20±0.39§	1.43±0.27*
HMW Bühlmann (µg/mL)	1.45±0.18	1.97±0.28*	2.05±0.38	1.31±0.20*	1.23±0.21§	0.81±0.12†
HMW Bühlmann (%)	0.37±0.02	0.44±0.03*	0.46±0.03‡	0.38±0.02†	0.37±0.02§	0.25±0.03†
MMW Bühlmann (µg/mL)	1.02±0.13	0.87±0.12	0.87±0.12	0.76±0.10	0.68±0.14	0.67±0.10
MMW Bühlmann (%)	0.27±0.02	0.21±0.02	0.22±0.04	0.23±0.02	0.21±0.02	0.24±0.02
LMW Bühlmann (µg/mL)	1.33±0.12	1.46±0.14	1.35±0.18	1.32±0.12	1.23±0.09	1.29±0.12
LMW Bühlmann (%)	0.37±0.04	0.35±0.02	0.32±0.03	0.40±0.03*	0.42±0.03§	0.49±0.03*
<b>Tissue mRNA</b>						
Adipose Tissue Adiponectin (AU)	474.0±52.0	438.2±53.5	442.8±15.8	464.4±65.2	369.8±47.6	320.3±58.8
Muscle Adiponectin (AU)	0.16±0.07	0.44±0.24	0.12±0.03	0.42±0.19	0.21±0.08	0.24±0.06
Muscle AdipoR1 (AU)	13.15±1.78	13.47±1.90	10.37±1.24	11.53±1.98	7.59±0.87‡	7.50±0.72
Muscle AdipoR2 (AU)	2.90±0.45	2.79±0.30	2.07±0.19‡	1.89±0.25	1.35±0.09‡	1.49±0.09

Muscle APPL1 (AU)	223.9±17.1	223.6±20.8	181.2±13.8	188.5±19.1	155.1±12.4‡	165.3±7.2
-------------------	------------	------------	------------	------------	-------------	-----------

<sup>1</sup> Abbreviations: AU, Arbitrary Unit; HMW, high molecular weight; MMW, medium molecular weight; LMW, low molecular weight. All values are means ± SEMs. \*  $p < 0.05$ , †  $p < 0.01$  compared with baseline; ‡  $p < 0.05$  compared with active lean men at baseline, §  $p < 0.05$  compared with sedentary lean men at baseline. For mRNA data, the number of subjects is, respectively for muscle and adipose tissue, 9 and 7 for the active lean group, 7 and 7 for the sedentary lean group, and 10 and 9 for the sedentary overweight group.

## LEGENDS

**Figure 1:** Plasma total (R&D System, A) and HMW adiponectin (Millipore, B) concentrations in active lean (n=11) before and after one month of detraining and in sedentary lean (n=9) and sedentary overweight (n=11) men before and after two months of training at the current recommended levels. †  $p < 0.05$  vs active lean or vs sedentary overweight; \*  $p < 0.05$  vs baseline. Values are means  $\pm$  SEM.

**Figure 2:** Associations between the changes in circulating total (R&D System, A) and HMW adiponectin (Millipore, B) concentrations and in  $VO_{2peak}$  normalized for body weight induced by the physical activity interventions in active lean (n=11), sedentary lean (n=9) and sedentary overweight men (n=11).

**Figure 3:** Association analyses using mixed models that account for the repeated measures generated by the interventions between AdipoR1 (A), AdipoR2 (B) and APPL1 (C) muscle gene expression (mRNA), and  $VO_{2peak}$  in active lean (n=9), sedentary lean (n=7) and sedentary overweight men (n=10).

Figure1  
Click here to download Figure: Figure1.tiff

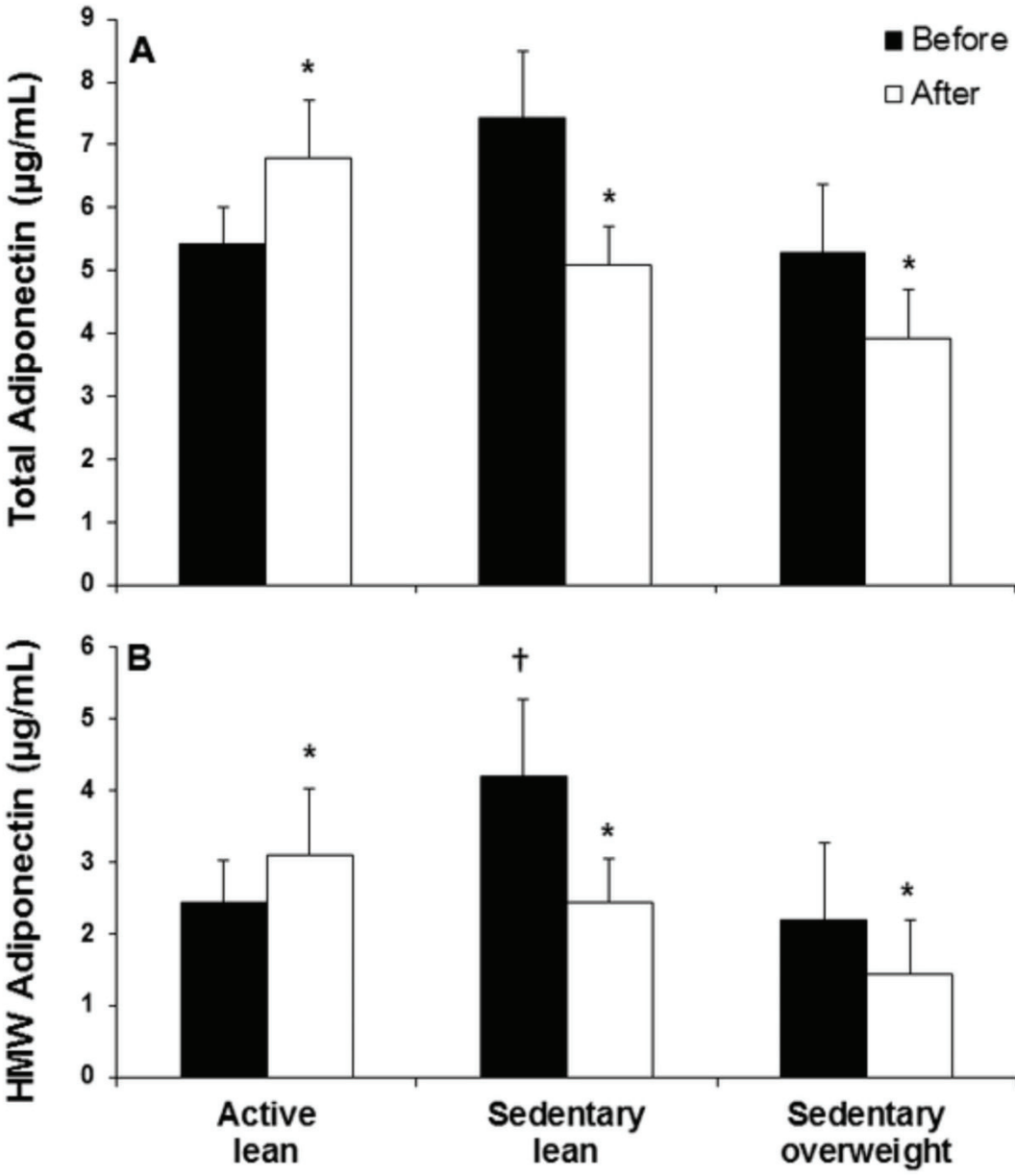
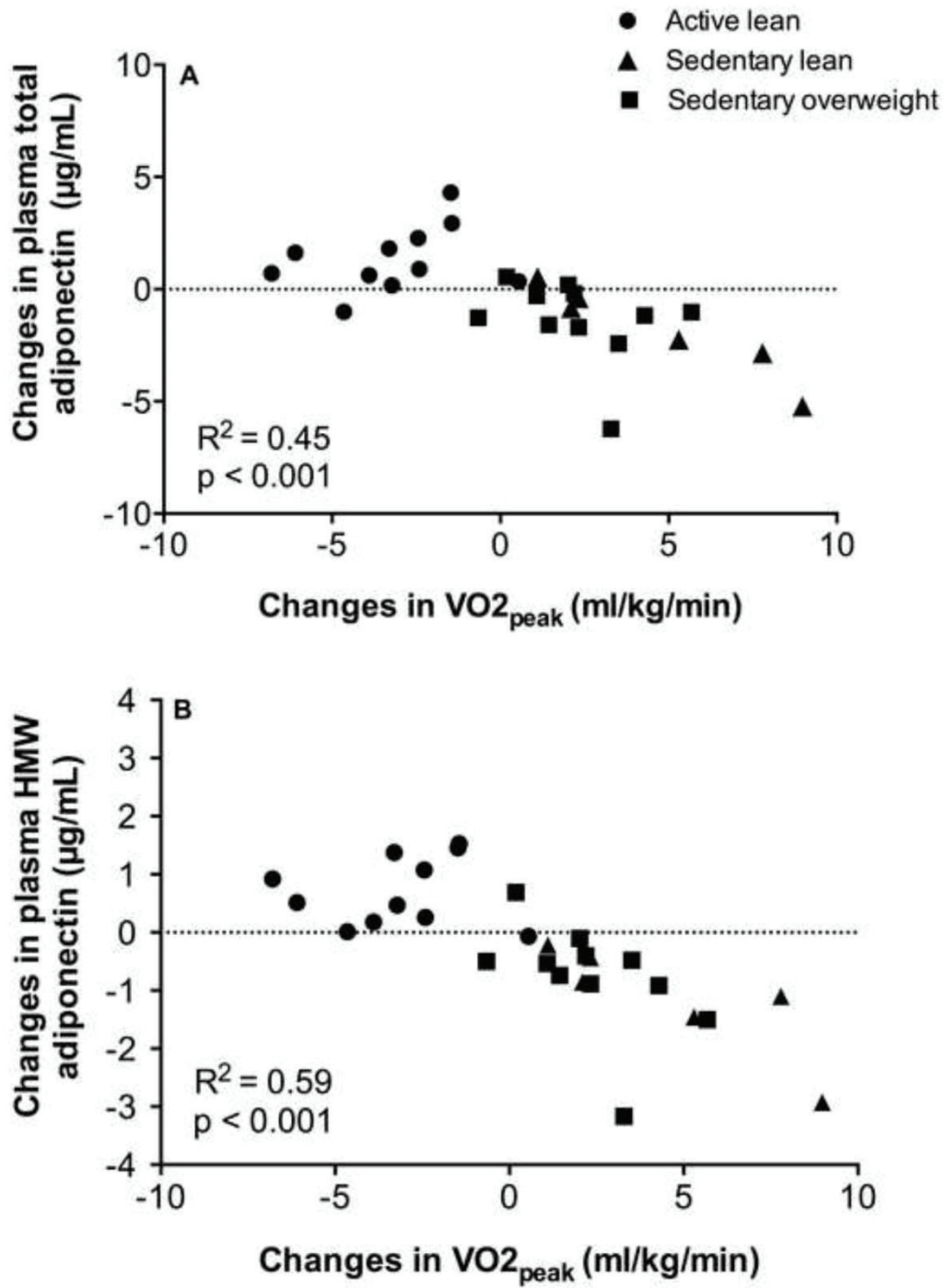
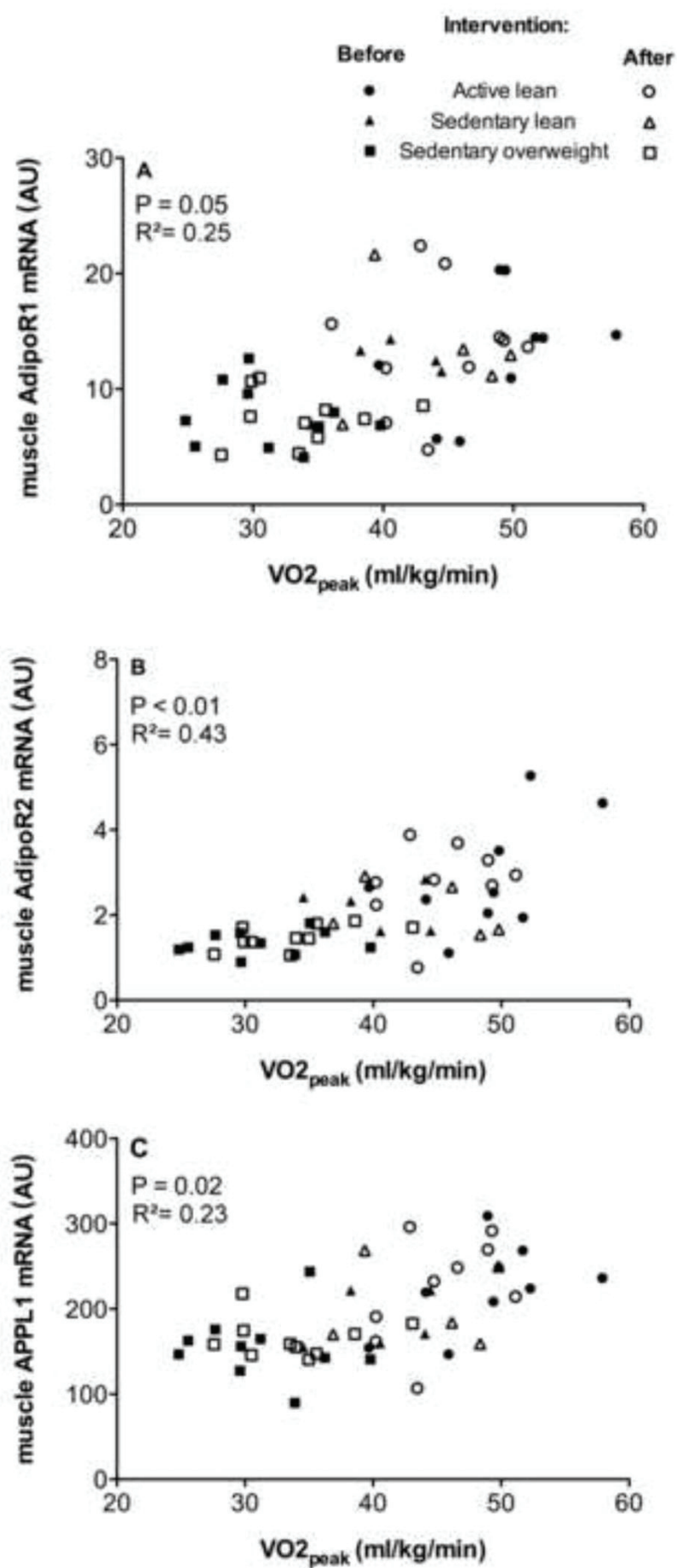


Figure2  
Click here to download Figure: Figure2.tiff







# ACTIVITE PHYSIQUE ET MICROARNS





Comme nous l'avons abordé dans le chapitre III de l'introduction, les microARNs sont présents dans les fluides corporels et leur implication dans le dialogue inter-organe a été suggérée. Plusieurs études ont montré que les niveaux circulants des microARNs peuvent être associés à des états pathologiques et servir, à ce titre, de biomarqueurs. De plus, certaines études ont montré un lien entre les taux circulants de certains microARNs et la capacité cardiorespiratoire. Au début de ces travaux de thèse, je me suis ainsi posée la question suivante : les concentrations circulantes de certains microARNs peuvent-elles refléter le niveau d'activité physique des individus, et servir ainsi de biomarqueurs. Dans ce contexte, j'ai pu examiner les microARNs circulants dans l'étude LIPOX où le niveau d'activité des sujets est bien caractérisé. Dans le cadre cette même étude, j'ai pu suivre l'évolution des microARNs en réponse à une intervention sur le niveau d'activité des sujets (entraînement ou désentraînement).

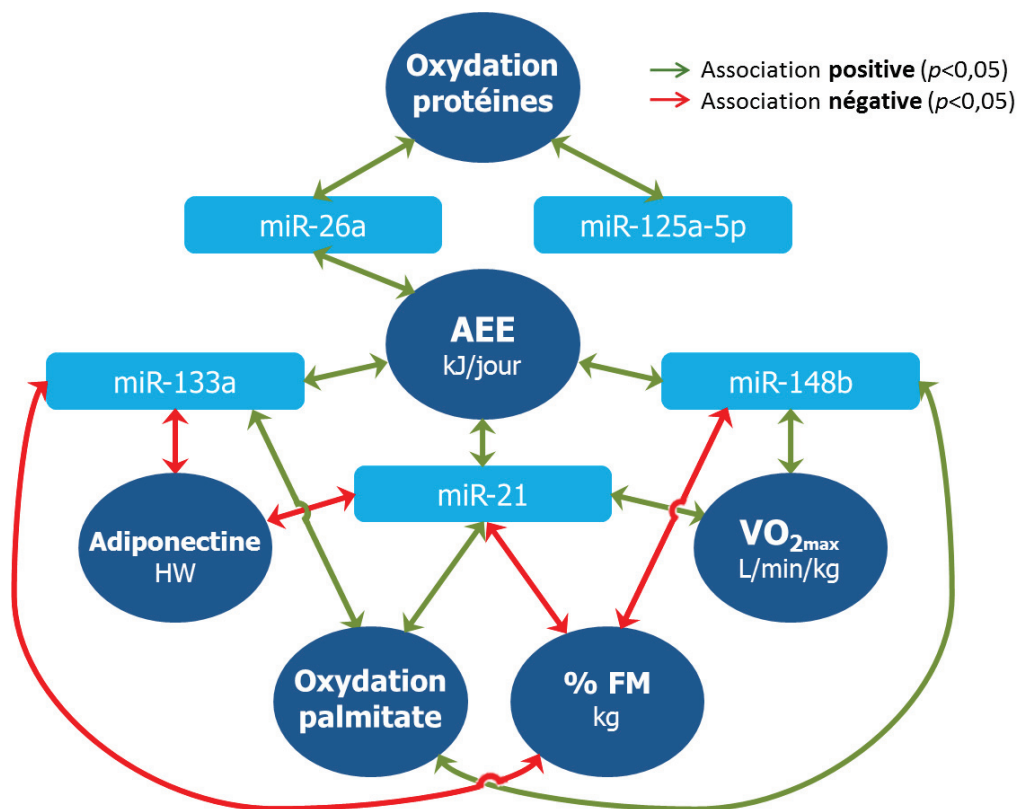
Dans un premier temps, une analyse transcriptomique des microARNs (cartes TLDA) du sérum a été réalisée sur un sous-échantillonnage des sujets de l'étude LIPOX, avant et après intervention sur le niveau d'activité physique. L'hypothèse était que les microARNs pouvant servir de biomarqueurs du niveau d'activité physique devaient varier en basal entre les groupes et/ou avec l'intervention. Plusieurs microARNs ont ainsi pu être identifiés, et ont ensuite été validés par dosage individuel. Les associations entre les paramètres métaboliques mesurés dans les protocoles et taux circulants de ces microARNs ont ensuite été examinées.

#### A. Sélection des microARNs associés à l'activité physique dans LIPOX

L'analyse transcriptomique des microARNs a montré des différences dans les niveaux circulants de certains microARNs en basal entre les sujets et/ou avec l'intervention, notamment miR-26a, miR-125a-5p, miR-133a, miR-133b, miR-146a, miR-148b, miR-21, miR-let7b et miR-885-5p. Ces microARNs ont ensuite été validés par un dosage individuel chez tous les sujets de LIPOX, les sujets actifs normo-pondérés et les sujets inactifs normo-pondérés et en surpoids. Parmi ces microARNs, nous avons remarqué que les changements du niveau d'expression de certains microARNs (miR-let7b, miR-885-85p, miR-146a, miR-133b) n'étaient pas liés à la modulation du niveau d'activité physique, *i.e.* les niveaux diminuaient par exemple chez tous les sujets, peu importe le groupe. De ce fait, nous les avons

écartés, et poursuivi l'étude avec les autres microARNs, miR-26a, miR-125a-5p, miR-133a, miR-148b et miR-21, dont les changements dans la circulation concordaient avec la modulation du niveau d'activité physique.

Nous avons ensuite examiné les relations entre les niveaux circulants de ces microARNs et les paramètres métaboliques des sujets, à l'aide de modèles mixtes permettant ainsi de tenir compte des données en basal et après intervention (Figure 28). On peut noter que parmi ces cinq microARNs, seules les concentrations circulantes de mir-125a-5p ne sont pas associées avec la dépense énergétique liée à l'activité physique AEE. De plus, la capacité cardiorespiratoire  $VO_{2max}$  est associée à deux de ces microARNs, mir-148b et miR-21, ce dernier étant connu comme un microARN spécifique du muscle.



**Figure 28. Associations entre les paramètres métaboliques et les concentrations plasmatiques des microARNs chez les sujets de l'étude LIPOX.** Ces associations ont été évaluées à l'aide de modèles mixtes. AEE, Dépense énergétique liée à l'activité physique ;  $VO_{2max}$ , capacité cardiorespiratoire ; FM, Masse grasse ; HW, Haut poids moléculaire.

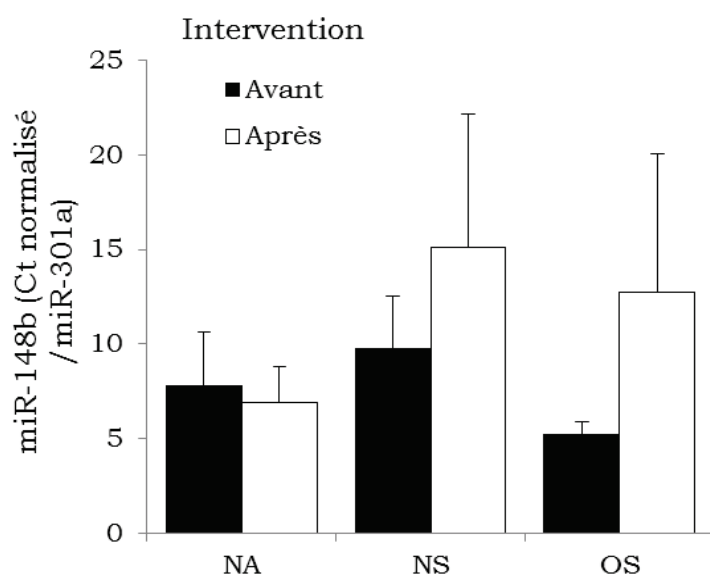
L'objectif initial étant d'identifier un ou des microARN(s) biomarqueur(s) du niveau d'activité physique chez les individus, nous avons voulu vérifier nos résultats dans les sérums de sujets dont le niveau d'activité physique est également caractérisé. Nous avons ainsi exploré les niveaux circulants de ces microARNs dans

les sérums des autres protocoles que nous avons à disposition (St Etienne, Nouvelle-Zélande, cf. Matériels et Méthodes A.1.c). L'utilisation de miR-301a comme contrôle interne a permis de normaliser les résultats de mesures des taux circulants de microARNs dans les différents protocoles. Malgré cette normalisation, nous n'avons pas pu montrer de lien entre les taux circulants des microARNs et le niveau d'activité physique. En effet, les résultats montrent des discordances, certains sujets de même niveau d'activité physique présentant des niveaux d'expression différents et inversement des sujets avec des niveaux d'exercice différents présentant des niveaux d'expression comparables.

Au vu de ces résultats, nous n'avons pas pu identifier un microARN dont les taux circulants absolus pouvaient indiquer clairement et sans ambiguïté le niveau d'activité physique des sujets. Cependant, les associations entre les niveaux circulants et les paramètres métaboliques indiquent que ces microARNs peuvent être impliqués dans des mécanismes sous-jacents de l'activité ou inactivité physique, nous avons donc souhaité explorer l'implication cellulaire de certains de ces microARNs, notamment au niveau du muscle, des résultats qui font l'objet de l'article 3. Ayant focalisé sur le microARN miR-148b dans ce manuscrit, les résultats concernant les taux plasmatiques de miR-148b sont développés ici.

## B. Niveaux d'expression de miR-148b dans le sérum

Les niveaux d'expression de miR-148b dans le plasma ont été normalisés sur les niveaux d'expression de miR-301a-3p, sélectionné comme miR endogène stable de référence (voir partie E.4.b du Matériels et Méthodes).

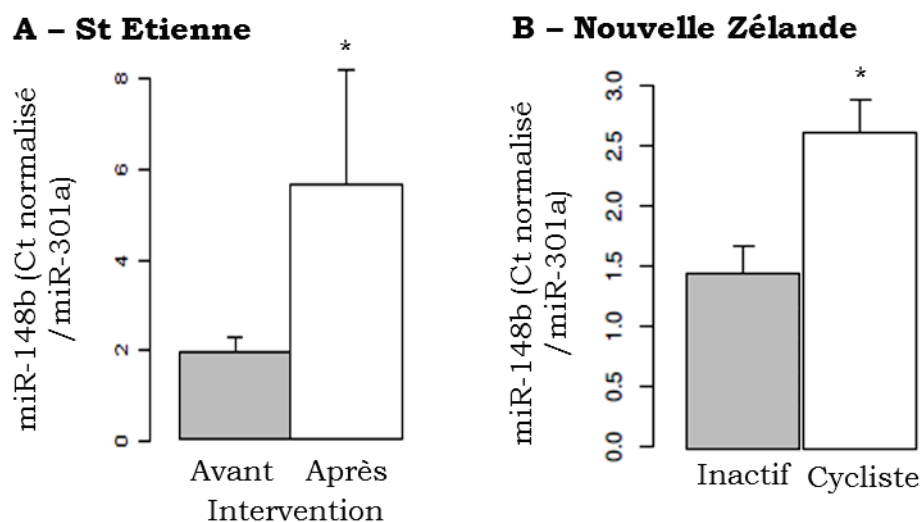


Les niveaux d'expression de miR-148b dans les sérums des sujets actifs et inactifs de l'étude LIPOX ne sont pas différents entre les sujets avant intervention, *i.e.* selon le niveau d'activité physique en basal (Figure 29). L'intervention ne change pas significativement les niveaux d'expression de

**Figure 29. Taux circulants de miR-148b dans le plasma des sujets de LIPOX.** NA, normo-pondérés actifs ; NS, normo-pondérés inactifs ; OS, inactifs en surpoids.

miR-148b chez ces sujets. On peut seulement noter une tendance inverse aux variations observées dans le tissu musculaire, *i.e.* une augmentation des taux circulants chez les sujets suivant l'entraînement alors que le niveau d'expression ne variait pas dans le muscle, et aucun changement des taux plasmatiques de miR-148b avec le désentraînement alors que celui-ci augmentait l'expression musculaire de miR-148b.

Par ailleurs, les niveaux circulants de miR-148b sont augmentés dans le sérum après un entraînement de 14 semaines constitué de 3 séances par semaine d'une heure et demie combinant un travail d'endurance sur cycloergomètre et de résistance musculaire, chez des sujets en surpoids (Figure 30a). De plus, les sujets néozélandais actifs, *i.e.* pratiquant du vélo, présentent un taux circulant de miR-148b plus élevé que des sujets inactifs (Figure 30b).



**Figure 30. Taux circulants de miR-148b dans le plasma de sujets de sexe masculin en bonne santé.** A/ Chez des sujets en surpoids, avant et après entraînement combinant exercice aérobique et en résistance (n=8). B/ Chez des sujets inactifs (n=7) et actifs (cycliste, n=11) de Nouvelle-Zélande.

### C. Associations entre taux circulants de miR-148b et paramètres métaboliques

Nous avons exploré les relations entre les concentrations plasmatiques de miR-148b et les différents paramètres métaboliques mesurés dans les protocoles.

Les changements des taux circulants de miR-148b sont associés positivement avec les changements de dépense énergétique liée à l'activité physique (AEE KJ/jour/kg) ( $r^2=0,64$ ,  $p<0,001$ ) et l'oxydation du palmitate ( $r^2=0,31$ ,  $p<0,05$ ) dans le protocole LIPOX (pas de mesure de l'AEE dans les autres protocoles), et

inversement avec la glycémie à jeun ( $r^2=0,29$ ,  $p<0,05$ ) et l'hémoglobine glyquée (Hb1Ac) ( $r^2=0,53$ ,  $p<0,05$ ) dans les sérums des sujets en surpoids de St Etienne.

La discussion de ces résultats complémentaires à l'article 1 est intégrée à la discussion générale.



## ARTICLE 3

Early transition from active to inactive status enhances mir-148b expression in skeletal muscle and consequences on insulin signaling

**La phase initiale de transition de l'activité physique vers l'inactivité augmente l'expression de miR-148b dans le muscle squelettique, conséquences sur la signalisation de l'insuline.**

**Caroline Gastebois**, Stéphanie Chanon, Sophie Rome, Audrey Jalabert, Vanessa Euthine, Christine Durand, Vincent Pialoux, Stéphane Blanc, Sophie Rome, Chantal Simon et Etienne Lefai

Soumis : Cell Communications and Signalling





## **Principaux résultats**

- Une étude observationnelle chez des sujets normo-pondérés en bonne santé ayant des **niveaux d'activité physique contrastés**, actifs ou inactifs, a montré des **différences dans les niveaux circulants de certains microARNs**.
- Le **désentraînement de 4 semaines** chez les sujets actifs a **augmenté l'expression musculaire de miR-148b**, alors que l'entraînement aérobie de 8 semaines chez les sujets inactifs n'a pas modifié le niveau d'expression de miR-148b dans le muscle.
- L'**augmentation du niveau d'expression de miR-148b** dans le muscle en réponse à une **diminution modérée du niveau d'activité physique** est confirmée dans un modèle de **souris**.
- La **modulation *in vitro* de miR-148b dans des myotubes humains** montre qu'il **régule négativement** l'expression protéique de **NRAS** et **ROCK1**, et que **seule la surexpression de miR-148b** dans ces cellules module la voie de signalisation de l'insuline, **diminuant** notamment la phosphorylation de **PKB/Akt**.
- En parallèle de l'augmentation de miR-148b, l'expression protéique musculaire de ces deux cibles, **NRAS** et **ROCK1**, est **diminuée dans le muscle *gastrocnemius* de souris**, suggérant une **altération du métabolisme** dans le muscle en réponse au **désentraînement impliquant miR-148b**.
- L'**augmentation de miR-148b** dans le muscle semblant être **associée à l'insulinémie à jeun et l'indice HOMA-IR**, l'ensemble de ces résultats suggère que **l'accumulation de miR-148b dans le tissu musculaire peut participer à l'altération de la sensibilité à l'insuline** à l'échelle du corps entier qui est caractéristique des comportements sédentaires persistants.



1 **Early transition from active to inactive status enhances mir-148b expression in**  
2 **skeletal muscle and consequences on insulin signaling.**

3  
4 Caroline Gastebois<sup>1</sup>, Stéphanie Chanon<sup>1</sup>, Sophie Rome<sup>1</sup>, Audrey Jalabert<sup>1</sup>, Vanessa Euthine<sup>1</sup>, Christine  
5 Durand<sup>1</sup>, Vincent Pialoux<sup>2</sup>, Stéphane Blanc<sup>3</sup>, Chantal Simon<sup>1</sup>, Etienne Lefai<sup>1</sup>

6  
7 <sup>1</sup>CARMEN Laboratory, INSERM U1060, INRA1397, University of Lyon 1, CRNH-RA,  
8 69600 Oullins, France

9 <sup>2</sup>Laboratoire CRIS EA 647, University of Lyon 1, Lyon, France

10 <sup>3</sup>IPHC CNRS, UMR 7178, University of Strasbourg, 67087 Strasbourg, France.

11  
12 **Corresponding author and person to whom reprint requests should be addressed:**

13 Etienne Lefai

14 Faculté de Médecine LYON SUD - BP 12

15 165 Chemin du Grand Revoyet

16 69921 OULLINS Cedex

17 France

18 Phone : +33(0)4 26 23 59 17

19 Fax : +33 (0)4 26 23 59 16

20 E-mail: [etienne.lefai@univ-lyon1.fr](mailto:etienne.lefai@univ-lyon1.fr)

21

22

23

24

## 25 **ABSTRACT**

### 26 **Background**

27 It is now established that physical inactivity and sedentary behaviour negatively impacts  
28 health independent of others factors including body weight or diet. Molecular factors involved  
29 in metabolic responses induced by inactivity are not completely understood. Recently  
30 identified MicroRNAs (miRNAs) are regulators of many gene networks. The present study  
31 investigated miRNAs as potential physiological modulators of inactivity-induced effects. To  
32 identify miRNAs involved in mechanisms associated with early stages of inactivity transition,  
33 we explored miRNA expression measured in two experimental conditions in human (LIPOX)  
34 and animal (SEDENT) with mild to moderate intervention leading to changes in the activity  
35 status. To identify their role in inactivity-induced biological process, we thus assessed miR-  
36 148b targets genes during the transition and explored consequences on signalling pathways  
37 thanks to *in vitro* in human primary differentiated myotubes.

### 38 **Results**

39 Our data showed that miR-148b expression was increased in skeletal muscle tissue of human  
40 (+37%,  $p < 0.05$ ) and mouse (+35%,  $p < 0.05$ ) during transition from active to inactive status  
41 but did not change upon exercise. Both NRAS and ROCK1 protein levels were  
42 downregulated (-38% and -37% respectively,  $p < 0.05$ ) in mice skeletal muscle, concomitantly  
43 with miR-148b increase. In human primary differentiated myotubes, NRAS and ROCK1  
44 protein levels were downregulated (-16% and -11% respectively,  $p < 0.05$ ) and  
45 phosphorylation of PKB was also decreased in response to 10  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$  insulin (-52%,  
46  $p = 0.052$  and -62%,  $p < 0.05$  respectively) when miR-148b was overexpressed.

### 47 **Conclusion**

48 Results obtained in animal and human protocols demonstrated that early phases of transitions  
49 towards sedentary behaviour is associated with an increase in muscle miR-148b content, that

50 triggered NRAs and ROCK1 target gene downregulation, thus possibly affecting the insulin  
51 sensitivity at the whole body level. This suggests that miRNAs play a role as physiological  
52 mediators of inactivity-induced deleterious effects.

53

54 **Key-words:** miRNAs, physical inactivity, insulin, human, skeletal muscle

55 **BACKGROUND**

56 Current lifestyle changes, notably sedentary behaviour and physical inactivity, are associated  
57 with chronic diseases, while regular activity improves metabolic functions. Actually,  
58 sedentary behaviours have been related to adverse health outcomes independently from  
59 physical activity [1-3]. Many studies have reported strong independent relations between  
60 sedentary behaviour and physical inactivity and higher risk of type 2 diabetes, cardiovascular  
61 disease and all-cause mortality [4, 5]. Considering early alterations on metabolism, physical  
62 inactivity, which is associated with fewer skeletal muscle contractions, has been shown to  
63 modify fat oxidation capacity [6, 7], reduce lipoprotein lipase activity [8], insulin sensitivity  
64 and glycaemic control [9] in skeletal muscle. Molecular factors involved in metabolic  
65 responses induced by exercise or inactivity are not completely acknowledged. The role of  
66 novel regulators, such as recently identified microRNAs (miRNAs), in inactive behaviours  
67 remains poorly understood.

68  
69 miRNAs are small non-coding RNAs approximately 18-24 bases long that regulate gene  
70 expression at the post-transcriptional level by degrading or inhibiting translation of the  
71 mRNA into protein. Currently, the critical role of miRNAs, which are highly conserved in  
72 eukaryotes, is evident in biological process including normal development, homeostasis and  
73 the cellular response to disease [10-12].

74 About 2600 miRNAs are identified in humans [13]. miRNA expression signatures are cell-  
75 type-specific [14] and some miRNAs can be detected in body fluids [15]. Recent studies have  
76 suggested that extracellular miRNAs play a role in cell-cell communication [16, 17]. Specific  
77 miRNAs are selectively released by cells and exert either autocrine, paracrine or endocrine  
78 effects, similarly to cytokines or hormones, by mediating intercellular gene regulation [18].

79

80 Among hundreds of miRNA currently known, a relatively small subset are known to be  
81 involved in biological processes of physical activity, including both health and disease  
82 conditions. Exercise, acute or chronic, aerobic or resistance, modifies profile of miRNAs in  
83 circulation, skeletal muscle, cardiovascular systems or central nervous system [19-21].  
84 However, the type and intensity of exercise could have opposite effects on skeletal muscle  
85 miRNA expression levels [20, 21]. To date, contrary to physical exercise, only few studies  
86 have examined miRNA levels upon transition toward sedentary behaviour and related  
87 biological process. Two bed rest studies [22, 23] and studies on rodent adaptations during the  
88 extreme inactivity induced by actual or simulated weightlessness [24, 25] have shown that  
89 experimental sedentary protocol induced expression changes in skeletal muscle miRNAs..

90

91 In human and animal experimental conditions of transition from active to inactive status, and  
92 opposite, we present here data on miRNA expression in the skeletal muscle tissue. We report  
93 that miR-148b expression is increased during transition to inactive status, but do not change  
94 after exercise training. We explored miR-148b targets genes during the processes and the  
95 consequences on signalling pathways. Results obtained in vivo and in vitro on muscle cells  
96 suggest that muscle content increase in miR-148b could participate in the reduction of insulin  
97 sensitivity in the early stages of inactivity transition.

98

99

## 100 **RESULTS**

101 To explore miRNAs changes in the early phases of transition from an active status toward a  
102 less active behaviour, we analysed two complementary protocols. The LIPOX protocol has  
103 been performed with healthy lean human subjects submitted to transition from active to  
104 inactive status, and opposite (Figure 1A). The SEDENT protocol has been performed in  
105 rodent with the wheel-lock model using adult mice (Figure 1B). Main biological



106 characteristics after and before intervention are presented in table 1 for humans, and in table 2  
107 for mice.

108 Inactive participants exhibited lower activity energy expenditure AEE and maximal oxygen  
109 consumption  $VO_{2peak}$  than the active participants (Table 1). Training in inactive men  
110 improved AEE and  $VO_{2peak}$ , whereas detraining in active men induced opposite changes.  
111 Transition from active to inactive status led to a moderate decrease in fat free mass FFM (-3.3  
112 %  $p<0.05$ ), whereas no difference was induced with training (Table 1).

113 At week 18, SED mice have a lower food intake compared to running mice ( $p<0.05$ , Table 2).

114 At sacrifice, no differences were found in Gastrocnemius muscle weight in all groups. After 2  
115 or 4 weeks of wheel lock, WL2 and WL4 mice do not present a significant increase in body  
116 weight, compared to SED or EX mice (Table 2).

117

### 118 ***Identification of circulating miRNAs differentially expressed between active and inactive*** 119 ***mens***

120 Serum miRNA profiling was first performed on a subgroup of 10 participants (6 active and 4  
121 inactive) from the 24 LIPOX participants before intervention. A total of 239 miRNAs was  
122 detected in the sera among the 671 screened by the PCR-based TaqMan technology.  
123 Statistical data analysis revealed that the mean expression level of 26 miRNAs was  
124 significantly different between active and inactive group before intervention (Wilcoxon test  
125  $p<0.05$ ). List of identified miRNAs and relative fold are presented in Table 3. Looking for  
126 actors involved in changes observed during physical activity transitions, we have focused this  
127 study on miR-148b. Its predicted target genes, analyzed from mirPath [29], are significantly  
128 enriched in genes involved the PI3K-Akt signaling pathway (hsa04151,  $p<0.001$ ) and insulin  
129 signalling pathway (hsa04910,  $p<0.01$ ).

130

131 ***Muscle miR-148b expression decrease in early phase of transition to inactivity***

132 As major changes occur within the skeletal muscle tissue during physical activity we next  
133 quantified miR-148b changes in muscle samples. First, we used LIPOX study to quantify  
134 miR-148b in muscle of active and inactive subjects before and after intervention. Results in  
135 figure 2A showed that detraining increased miR-148b expression level in muscle in active  
136 subjects (+37%,  $p<0.05$ ); while, despite a lower level of expression before intervention in the  
137 inactive group ( $p<0.05$ ), training did not significantly decrease miR-148b expression (Figure  
138 2A, Table 1).

139 To determine if miR-148b expression level is also promoted during transition in other models  
140 of inactivity induction, we examined muscle expression in mice submitted to a wheel-lock  
141 protocol. Exercise mice (EX) were compared to group where wheels have been locked for 2  
142 weeks (WL2), 4 weeks (WL4) and throughout the protocol (SED). As shown in figure 2B,  
143 miR-148b is also increased in the WL2 group (+35%,  $p<0.05$ ) and the WL4 group (+25%,  
144  $p<0.05$ ) compared to EX group. .

145 Transition to inactive status through a reduction in muscle use, both in human and animal  
146 model thus triggered an increase in skeletal muscle content of miR-148b. Meanwhile, the  
147 converse transition, from inactive to active status in humans through increase in physical  
148 activity did not show changes in skeletal muscle miR-148b expression.

149

150 ***ROCK1 and NRAS are muscle miR-148b target genes***

151 Among predicted target genes of miR-148b, NRAS and ROCK1 have been previously  
152 validated in mammary tumor cell lines [30]. As these two proteins are involved in insulin  
153 signaling and glucose metabolism, two skeletal muscle biological processes that are activated  
154 during physical activity, we aimed at determining whether mir-R-148b also regulated these  
155 two proteins in muscle.

156 We thus modulated miR-148b expression in *in vitro* experiments using muscle cells. Human  
157 primary differentiated myotubes were transfected with either microRNA inhibitor against  
158 miR-148b and micro-RNA expression plasmid to overexpress miR-148b. As shown in figure  
159 3, both NRAS and ROCK1 proteins levels were upregulated when miR-148b was inhibited  
160 (+18%,  $p=0.06$  and +21%,  $p<0.05$  respectively). Conversely, overexpression of miR-148b  
161 decreased both NRAS and ROCK1 protein expression (-16%,  $p<0.05$  and -11%,  $p<0.05$   
162 respectively). These data validated that NRAS and ROCK1 were target genes of miR-148b in  
163 human muscle.

164

### 165 ***Muscle cell modulation of miR-148b affects insulin signaling pathway***

166 As modulation of miR-148b expression levels affected muscle content in proteins involved in  
167 the insulin pathway, we next studied the effects of these modulations on insulin response  
168 measured through phosphorylation status of PKB and MAPK proteins.

169 Compared to control conditions, inhibition of miR-148b in human myotubes had no effect on  
170 phosphorylation of PKB in response to 10 $\mu$ M and 100 $\mu$ M insulin; while overexpression of  
171 miR-148b decreased phosphorylation of PKB (-52%,  $p=0.05$  and -62%,  $p<0.05$  respectively)  
172 in response to insulin (respectively Figure 4A and B). When examining the MAPK pathway,  
173 modulation of miR-148 content in human myotubes did not modified p42/44 phosphorylation  
174 status, whatever miR-148b was inhibited or increased (Figure 4C and D). In muscle cells,  
175 increase in miR-148b can thus inhibit insulin response, through downregulation of NRAS and  
176 ROCK1 proteins.

177

### 178 ***In vivo Muscle consequences of miR-148b changes***

179 As we validated that NRAS and ROCK1 were target genes of miR-148b in human muscle  
180 cells, we then quantified the two protein levels in skeletal muscle from mouse, in the EX and

181 WL2 groups where higher differences in miR-148b were highlighted (Figure 2B). As shown  
182 in figure 5A, 2 weeks of forced inactivity triggered NRAS and ROCK1 protein decrease (both  
183  $p < 0.05$ ), concomitantly with the increase of miR-148b.

184 As we also observed an increase in miR-148b in human muscle during transition to inactive  
185 status, and no change during training (figure 2A), we finally explored the correlation between  
186 changes in miR-148b expression and insulin sensitivity parameters in these two groups.  
187 Despite the very low number of pairs that can be associated in each group, we tried to  
188 associate muscle miR-148b changes with insulin sensitivity parameters. A positive correlation  
189 is observed in figure 5B, with changes in muscle miR-148b significantly correlated with  
190 fasting circulating insulin level in the inactivity induced group ( $r^2 = 0.78$ ,  $p < 0.01$ ), but not in  
191 the training one ( $r^2 = 0.25$ ,  $p = 0.29$ ). Similarly, the same positive significant correlation is found  
192 with the HOMA-IR ( $r^2 = 0.68$ ,  $p = 0.03$ , data not shown) in the inactivity transition group.

193

## 194 **DISCUSSION**

195 Physical inactivity and sedentary lifestyle affect the whole body and leads to development of  
196 chronic disease involving several organs. The molecular events occurring in skeletal muscle  
197 tissue during the early stages of transition from active toward inactivity are poorly  
198 understood, and characterization of key events such as development of insulin resistance is of  
199 major relevance. Among many muscle factors that are regulated by physical activity, our  
200 study focused on miRNAs associated with transition from active to inactive status in two  
201 parallel experiments in human and animal.

202 We showed that the transition toward inactivity increased miR-148b muscle content in human  
203 and mice models, while opposite transition (toward activity) did not decrease muscle miR-  
204 148b content. Muscle disuse can also increase miR-148b expression as observed in the soleus  
205 muscle in rats after 7 days of hindlimb suspension [25]. However miR-148b was

206 downregulated in a 10-day bed rest procedure [23]. The discrepancy between our data and the  
207 regulation of muscle miR-148b in the study of Rezen et al. [23], could be related to difference  
208 in duration (10 days against 28 days in our protocol), and/or intensity as bed-rest reflects more  
209 sedentary behaviour. In fact, our models reflect more lifestyle inactive behaviour compared to  
210 above extreme experimental conditions. Regardless of the differences in the experimental  
211 design previous studies, all results suggest miR-148b have a role in inactivity transition.

212

213 *In vitro* experiments in human primary differentiated myotubes, demonstrated that  
214 overexpression of miR-148b decreased NRAS and ROCK1 protein level in muscle, whereas  
215 inhibition of miR-148b induced opposite effects. Interestingly, we found that only the  
216 overexpression of miR-148b in this model had an effect on the insulin response in muscle  
217 cell. Indeed, decrease of NRAS and ROCK1 induced by overexpression of miR-148b, were  
218 associated with PKB/Akt phosphorylation alteration. miR-148b is frequently downregulated  
219 in various cancers suggesting that miR-148b may play an important role as tumour  
220 suppressor. In fact, overexpression of miR-148b inhibited cell proliferation by targeting  
221 PIK3R3 (subunit p55 of the PI3Kinase) in colorectal cancer cells [31], AMPK $\alpha$ 1 in pancreatic  
222 cancer [32], or WNT1/ $\beta$ -catenin pathway in hepatocellular carcinoma [33]. Further, miR-  
223 148b was increased in B-cell lymphoma cells in response to radiotherapies and then enhance  
224 apoptosis of Raji cells after irradiation [34].

225 The 2 targets of miR-148b NRAS and ROCK1 validated in our study, involved in insulin and  
226 glucose pathways, were increased in aggressive breast tumor [30]. It is known that deficiency  
227 of ROCK1 causes insulin resistance by impairing insulin signalling in skeletal muscle in mice  
228 [35], and ROCK1 was demonstrated to play an important role as positive regulator of insulin  
229 action on glucose transport in adipocytes and muscle cells [36]. In line with these data, we

230 found in this study that NRAS and ROCK1 proteins were decreased with reduction in muscle  
231 load in mice, accordingly to miR-148b increases.

232 Two studies [30, 37] have shown that miR-148b was involved in the PKB/Akt pathway.  
233 Bischoff *et al.* [37] have notably demonstrated that downregulation of ErbB3 receptor by  
234 miR-148b affects PI3K-Akt pathway. In mice with chronic kidney disease, Peng et al. [38]  
235 have demonstrated that ROCK1 stimulates PTEN activity, thus diminishing PKB/Akt activity.  
236 Moreover, Chun et al. [39] have showed a disruption of ROCK1 activity in response to  
237 insulin in muscle of TD2 obese subjects without change in ROCK1 protein levels,  
238 highlighting the role of ROCK1 in the development and maintenance of resistance to insulin  
239 action on glucose disposal in muscle.

240 As we found that miR-148b increase in muscle during inactivity transition could be  
241 positively related to changes in fasting insulinemia and HOMA-IR, exploration of larger  
242 cohort will allow to fully characterize the impact on muscle insulin sensitivity and whole  
243 body metabolic parameters. Interestingly, as only transition toward inactive status but not  
244 transition from inactive to active status, modified muscle expression of miR-148b, we also  
245 showed that only overexpression of miR-148b had an effect on insulin pathway. This suggests  
246 that distinct pathways are involved in transitions toward or from physical active status, and  
247 that muscle answers to these changes involved distinct actors [6]. It also will be of major  
248 relevance to explore the transcriptional regulation of miR-148b, to study the factors that  
249 regulate its expression, and to fully identify its targets gene and biological action in the  
250 muscle tissue.

251

## 252 **CONCLUSIONS**

253 Our data support the global hypothesis that early phase of transition toward inactivity results  
254 in muscle miR-148b content increase leading to specific acute change in muscle metabolism,

255 and could participate in the whole body insulin sensitivity degradation, before chronic  
256 disorders installation when inactive behaviours persist.

257  
258

## 259 **METHODS**

260

### 261 *Subjects and study protocol*

262 The protocol and main outcomes of LIPOX are detailed elsewhere [6]. Briefly, twenty-four  
263 men who were free of any chronic known diseases and weight stable for at least 3 months  
264 before enrolment were included in the study and divided into two groups (n = 12) according  
265 to their active/inactive status: active and inactive participants. Inactive men were submitted to  
266 2 months of moderate physical training at current recommendations, i.e. three 60-min  
267 supervised sessions/wk at 50%  $VO_{2peak}$  (peak oxygen uptake) on a cycle ergometer and one  
268 additional session in free-living conditions during week-ends. Active men were submitted to 1  
269 month of detraining, *i.e.* suspension of all structured physical activities and reduction of  
270 spontaneous activities of daily living (Figure 1A). The  $VO_{2peak}$  was measured before and after  
271 intervention on a cycle ergometer. The diet was regularly adjusted by a nutritionist to  
272 maintain subject energy balance. Written consent was obtained from each subject prior  
273 involvement in the study. The study was approved by the Institutional Review Board of  
274 Alsace-1. Characteristics of participants are summarized in table 1. Muscle biopsies were  
275 available for 15 participants (7 active and 8 inactive).

276

### 277 *Animals and experimental design*

278 Twenty-seven male 5 weeks old C57BL/6 mice were housed at standard conditions (22°C,  
279 12/12h dark light cycle, food and water ad libitum). All experimental procedures were  
280 accepted by local ethic committee (Ethic Committee Neurosciences- Lyon CELYNE,

281 protocol C2EA42-11-10-0501-003) and performed in accordance to relevant national and  
282 European legislation, throughout the experiments.

283

284 After a week of initial acclimatization, mice were randomly affected to one of the 4  
285 experimental groups (Figure 1B): no exercise (SED, n=6), exercise (EX, n=7), exercise  
286 followed by 2-weeks detraining (WL2, n=7) and exercise followed by 4-weeks detraining  
287 (WL4, n=7). Mice were housed in individual cage equipped with a 15cm radius voluntary  
288 running wheel outfitted with a BC800 bicycle computer (Sigma GmbH, Neustadt, Germany).  
289 Wheel rotation numbers were recorded daily to calculate running distance (km/day).  
290 Cessation of voluntary exercise was obtained by locking wheels in WL2 and WL4 cages at 18  
291 weeks of age. In all groups, body weight (g) and food intake (g/day) were measured twice a  
292 week.

293

#### 294 *Culture of Skeletal Muscle Cells*

295 For human primary myotubes, *rectus abdominis* or *gluteus maximus* muscle biopsies were  
296 taken from healthy lean subjects during planned surgery (n=6, M/F=3/3, age=58.5±4.4,  
297 BMI=24.5±2.0). All patients gave their written consent after being informed of the nature,  
298 purpose and possible risks of the study. The experimental protocol (DIOMEDE) was  
299 approved by the Ethical Committees SUD EST IV (Agreement 12/111) and performed  
300 according to the French legislation (Huriet's Law). The myoblasts were purified and  
301 differentiated into myotubes according to the procedure previously described in detail [26].

302

#### 303 *Modulation of miR-148b expression in Human primary muscle cells*

304 Inhibition of miR-148b expression was performed using microRNA inhibitor (hsa-miR-148b-  
305 3p miRCURY LNA microRNA inhibitor, 5'-fluorescein labeled) and compared to control



306 (Negative control A miRCURY LNA<sup>TM</sup> microRNA inhibitor control, 5nmol, 5'-fluorescein  
307 labeled) from Exiqon (Vedbæk, Denmark). Fully differentiated myotubes (7 days) were  
308 transfected for 48h with 100 pmols of microRNA inhibitor using the Hiperfect transfection  
309 reagent (Qiagen) according to the manufacturer's protocol.

310 miR-148b overexpression was performed using micro-RNA expression plasmid (HmiR0185-  
311 MR04, precursor miRNA expression clone for has-mir-148b) and compared to control  
312 (CmiR0001-MR04, miRNA scrambled control clone for pEZXR04) from GeneCopoeia  
313 (Labomatics, Nivelles, Belgium). Fully differentiated myotubes (7 days) were transfected for  
314 48h with 2 µg micro-RNA expression plasmid using the Exgen500 transfection reagent  
315 (Euromedex, Souffelweyersheim, France) according to the manufacturer's protocol.

316 For insulin signalling assays, myotubes were serum starved for one night before insulin  
317 stimulation (10 or 100 µM) for 10 minutes.

318

### 319 *RNA isolation*

320 RNA from -80°C frozen human serum (500µL), -80°C frozen *gastrocnemius lateralis* mouse  
321 muscle, and human primary myotubes were isolated using the Tri Reagent (Sigma, St Quentin  
322 Fallavier, France). RNA from the -80°C frozen *vastus lateralis* human muscle biopsies were  
323 extracted using the mirVana miRNA Isolation Kit protocol (Life Technologies, Saint Aubin,  
324 France).

325

### 326 *Global Serum microRNA Profiling*

327 Global serum miRNA profiling was performed at baseline for active (n=6) and inactive (n=4)  
328 participants of the LIPOX protocol, using TaqMan Human miRNA Arrays (Life technology,  
329 Saint Aubin, France) according to the manufacturer's protocol (supplemental data 1). The  
330 amplification was performed in Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System, in

331 384 well plates. The amplification curves were analyzed using the RQ Manager software  
332 (Applied Biosystems). All assays were inspected for distinct melting curves and the T<sub>m</sub> was  
333 checked to be within known specifications for the assay. Only miRNAs detected with Ct<37  
334 were included in the data analysis. Using Vandesompele *et al.* method [27] the most stably  
335 expressed control microRNAs were listed. Among them, we selected miR-301a as  
336 endogenous standard control to normalize data, as it was not differentially expressed among  
337 our conditions, *i.e.* between groups or with intervention. Comparisons between groups were  
338 made by using the Wilcoxon test (p<0.05) on normalized data, to select the differentially  
339 expressed miRNAs.

340

#### 341 *Individual quantification of miRNAs by qRT-PCR*

342 To quantify miR-148b, total RNA from serum and muscle biopsies were extracted as  
343 described above. 1 µl total serum RNA and 50 ng total muscle RNA were reverse transcribed  
344 in 15 µl reactions using the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (4366596, Life  
345 technology, Saint Aubin, France). cDNA was diluted 16x and assayed in 20 µl PCR reactions  
346 using TaqMan Universal PCR Master Mix (4324018, Life technology, Saint Aubin, France)  
347 and a Rotor-Gene<sup>TM</sup> 6000 (Qiagen, Courtaboeuf, France). miRNA probes used were hsa-  
348 mir148b-3p (000471, MI0000811) and hsa-mir-301a-3p (000528, MIMAT0000688) from  
349 Life technology (Saint Aubin, France). Relative expression of microRNA expression was  
350 calculated by 2<sup>-ΔCt</sup> method, where ΔCt was calculated as C<sub>t</sub><sub>miR</sub>-C<sub>t</sub><sub>miR301a</sub>.

351

#### 352 *Protein expression analyses by Western-blotting*

353 Cells were lysed in lysis buffer (PBS, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Nonidet  
354 NP40, 5 mmol/l EDTA, 1 mmol/l Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 20 mmol/l NaF, 1 mmol/l dithiothreitol, protease  
355 inhibitors). Mice muscle biopsies were lysed in tissue lysis buffer (NaCl, 0.1% SDS, 0.5%

356 sodium deoxycholate, 1% NP40-igepal, 50 mM Tris, Cocktail inhibitor protease) (Sigma, St  
357 Quentin Fallavier, France).

358 10 µg of total protein extracts were loaded of 10% SDS PAGE, transferred to PVDF  
359 membrane and immunoblotted with: monoclonal antibodies against phospho-Ser<sup>473</sup> PKB (Cell  
360 Signaling); PKB (pan) (Cell Signaling); phospho-Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup> p44/42 MAPK (Erk1/2) (Cell  
361 Signaling); p44/42 MAPK (Erk1/2) (Cell Signaling); N-RAS (Santa Cruz Biotechnology);  $\alpha$ -  
362 Tubulin (Sigma-Aldrich); or polyclonal antibodies against ROCK1 (Santa Cruz  
363 Biotechnology). Goat anti-mouse and goat anti-rabbit conjugated IgG were from Bio-Rad  
364 (Marnes-la-Coquette, France).

365

### 366 *Statistical analysis of biological samples*

367 Data are presented as mean ( $\pm$  SEM). Selection of a endogenous control miRNA to normalize  
368 PCR data from serum was performed using Vandesompele method and using R software [28].  
369 Others statistical analyses were performed using SAS 9.3 software (SAS Institute Inc., Cary,  
370 NC). Wilcoxon tests were used to test differences between groups at baseline in TaqMan  
371 Human miRNA Arrays data. Wilcoxon tests were also used to test differences between mice  
372 groups.

373 Analyses on individual RT-qPCR and cells experiments data were done using mixed linear  
374 models, taking into account repeated individual data over time, with groups and interventions  
375 as fixed effects and individuals as random effect. Post-hoc Tukey tests were used to test  
376 baseline between-group differences and the effects of interventions in each group. Regression  
377 analyses were used to test associations between selected miRNA expression level and  
378 metabolic parameters.

379

380

381 **ABBREVIATIONS**

- 382 AEE Activity energy expenditure  
383 BMI Body mass index  
384 EX exercise  
385 FFM Fat free mass  
386 FM Fat mass  
387 HOMA-IR Homeostasis Model Assessment – Insulin resistance  
388 MOSPA Monica optional study of physical activity  
389 miRNA microRNA  
390 PCR Polymerase chain reaction  
391 PI3K/PKB/Akt Phosphoinositide 3-kinase  
392 MAPK Mitogen-activated protein kinases  
393 NRAS Neuroblastoma RAS Viral (V-Ras) Oncogene Homolog  
394 RNA Ribonucleic acid  
395 ROCK1 Rho-Associated, Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1  
396 RT-PCR Real-time PCR  
397 SEM standard error of the mean  
398 SED no exercise  
399  $VO_{2peak}$  maximal oxygen consumption  
400 WL2 exercise followed by 2-weeks detraining  
401 WL4 exercise followed by 4-weeks detrained

402

403 **Competing interests**

404 The authors declare that they have no competing interests.

405

406 **Authors' contributions**

407 E.L., V.P., S.B. and C.S. conception and design of research; C.G., S.C., A.J., V.E., C.D., S.B.  
408 and E.L. performed experiments; C.G., and E.L. analyzed data; C.G., and E.L. drafted  
409 manuscript; C.G., S.C., S.R., S.B., C.S. and E.L. edited and revised manuscript; C.G., S.C.,  
410 S.R., A.J., V.E., C.D., V.P., S.B., C.S. and E.L. approved final version of manuscript.

411

412 **Acknowledgements**

413 We thank A. Geloën and E. Canet-Soulas for scientific advices and technical assistance. This  
414 study was supported by grants from: Fondation Cœur et Artères; University Hospital of  
415 Strasbourg, France; French National Agency for Research (PRNA); Centre National de la  
416 Recherche Scientifique (CNRS); French Ministry of Higher Education and Research through  
417 a fellowship (to CG).

418 **References**

419

- 420 1. de Rezende LFM, Rodrigues Lopes M, Rey-López JP, Matsudo VKR, Luiz OdC:  
421 **Sedentary Behavior and Health Outcomes: An Overview of Systematic**  
422 **Reviews.** *PLoS ONE* 2014, **9**:e105620.
- 423 2. Thorp AA, Owen N, Neuhaus M, Dunstan DW: **Sedentary Behaviors and**  
424 **Subsequent Health Outcomes in Adults: A Systematic Review of**  
425 **Longitudinal Studies, 1996–2011.** *American Journal of Preventive Medicine*  
426 2011, **41**:207-215.
- 427 3. Tremblay MS, Colley RC, Saunders TJ, Healy GN, Owen N: **Physiological and**  
428 **health implications of a sedentary lifestyle.** *Appl Physiol Nutr Metab* 2010,  
429 **35**:725-740. doi: 710.1139/H1110-1079.
- 430 4. Edwardson CL, Gorely T, Davies MJ, Gray LJ, Khunti K, Wilmot EG, Yates T, Biddle  
431 SJ: **Association of sedentary behaviour with metabolic syndrome: a meta-**  
432 **analysis.** *PLoS One* 2012, **7**:e34916. doi: 34910.31371/journal.pone.0034916.  
433 Epub 0032012 Apr 0034913.
- 434 5. Grøntved A, Hu FB: **Television Viewing and Risk of Type 2 Diabetes,**  
435 **Cardiovascular Disease, and All-Cause Mortality A Meta-analysis.** *JAMA* 2011,  
436 **305**:2448-2455.
- 437 6. Bergouignan A, Momken I, Lefai E, Antoun E, Schoeller DA, Platat C, Chery I,  
438 Zahariev A, Vidal H, Gabert L, et al: **Activity energy expenditure is a major**  
439 **determinant of dietary fat oxidation and trafficking, but the deleterious**  
440 **effect of detraining is more marked than the beneficial effect of training at**  
441 **current recommendations.** *Am J Clin Nutr* 2013, **98**:648-658. doi:  
442 610.3945/ajcn.3112.057075. Epub 052013 Jul 057031.
- 443 7. Laye MJ, Rector RS, Borengasser SJ, Naples SP, Uptergrove GM, Ibdah JA, Booth  
444 FW, Thyfault JP: **Cessation of daily wheel running differentially alters fat**  
445 **oxidation capacity in liver, muscle, and adipose tissue.** *J Apply Physiol* 2009,  
446 **106**:161-168.
- 447 8. Zderic TW, Hamilton MT: **Physical inactivity amplifies the sensitivity of**  
448 **skeletal muscle to the lipid-induced downregulation of lipoprotein lipase**  
449 **activity.** *1985) 2006*, **100**:249-257. Epub 2005 Sep 2029.
- 450 9. Reynolds LJ, Credeur DP, Holwerda SW, Leidy HJ, Fadel PJ, Thyfault JP: **Acute**  
451 **inactivity impairs glycemic control but not blood flow to glucose ingestion.**  
452 *Med Sci Sports Exerc* 2015, **47**:1087-1094. doi:  
453 1010.1249/MSS.0000000000000508.
- 454 10. Ebert MS, Sharp PA: **Roles for microRNAs in conferring robustness to**  
455 **biological processes.** *Cell* 2012, **149**:515-524.
- 456 11. Mendell JT, Olson EN: **MicroRNAs in stress signaling and human disease.** *Cell*  
457 2012, **148**:1172-1187.
- 458 12. Ivey KN, Srivastava D: **microRNAs as Developmental Regulators.** *Cold Spring*  
459 *Harb Perspect Biol* 2015, **7**:pii: a008144. doi:  
460 008110.001101/cshperspect.a008144.
- 461 13. Kozomara A, Griffiths-Jones S: **miRBase: annotating high confidence**  
462 **microRNAs using deep sequencing data.** *Nucleic Acids Research* 2014, **42**:D68-  
463 D73.

- 464 14. Sood P, Krek A, Zavolan M, Macino G, Rajewsky N: **Cell-type-specific signatures**  
465 **of microRNAs on target mRNA expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006,  
466 **103:2746-2751.** Epub 2006 Feb 2713.
- 467 15. Chevillet JR, Lee I, Briggs HA, He Y, Wang K: **Issues and prospects of microRNA-**  
468 **based biomarkers in blood and other body fluids.** *Molecules* 2014, **19:6080-**  
469 **6105.**
- 470 16. Hergenreider E, Heydt S, Treguer K, Boettger T, Horrevoets AJ, Zeiher AM,  
471 Scheffer MP, Frangakis AS, Yin X, Mayr M, et al: **Atheroprotective**  
472 **communication between endothelial cells and smooth muscle cells through**  
473 **miRNAs.** *Nat Cell Biol* 2012, **14:249-256.**
- 474 17. Patel SA, Gooderham NJ: **IL6 mediates immune and colorectal cancer cell**  
475 **crosstalk via miR-21 and miR-29b.** *Mol Cancer Res* 2015, **16.**
- 476 18. Boon RA, Vickers KC: **Intercellular transport of microRNAs.** *Arterioscler*  
477 *Thromb Vasc Biol* 2013, **33:186-192.**
- 478 19. Liu G, Detloff MR, Miller KN, Santi L, Houle JD: **Exercise modulates microRNAs**  
479 **that affect the PTEN/mTOR pathway in rats after spinal cord injury.** *Exp*  
480 *Neurol* 2012, **233:447-456.**
- 481 20. Davidsen PK, Gallagher IJ, Hartman JW, Tarnopolsky MA, Dela F, Helge JW,  
482 Timmons JA, Phillips SM: **High responders to resistance exercise training**  
483 **demonstrate differential regulation of skeletal muscle microRNA**  
484 **expression.** *J Apply Physiol* 2011, **110:309-317.**
- 485 21. Baggish AL, Park J, Min PK, Isaacs S, Parker BA, Thompson PD, Troyanos C,  
486 D'Hemecourt P, Dyer S, Thiel M, et al: **Rapid upregulation and clearance of**  
487 **distinct circulating microRNAs after prolonged aerobic exercise.** *J Apply*  
488 *Physiol* 2014, **116:522-531.**
- 489 22. Ringholm S, Bienso RS, Kiilerich K, Guadalupe-Grau A, Aachmann-Andersen NJ,  
490 Saltin B, Plomgaard P, Lundby C, Wojtaszewski JF, Calbet JA, Pilegaard H: **Bed**  
491 **rest reduces metabolic protein content and abolishes exercise-induced**  
492 **mRNA responses in human skeletal muscle.** *Am J Physiol Endocrinol Metab*  
493 2011, **301:649-658.**
- 494 23. Rezen T, Kovanda A, Eiken O, Mekjavic IB, Rogelj B: **Expression changes in**  
495 **human skeletal muscle miRNAs following 10 days of bed rest in young**  
496 **healthy males.** *Acta Physiol* 2014, **210:655-666.**
- 497 24. Allen DL, Bandstra ER, Harrison BC, Thorng S, Stodieck LS, Kostenuik PJ, Morony  
498 S, Lacey DL, Hammond TG, Leinwand LL, et al: **Effects of spaceflight on murine**  
499 **skeletal muscle gene expression.** *J Appl Physiol* 2009, **106:582-595.**
- 500 25. McCarthy JJ, Esser KA, Peterson CA, Dupont-Versteegden EE: **Evidence of**  
501 **MyomiR network regulation of  $\beta$ -myosin heavy chain gene expression**  
502 **during skeletal muscle atrophy.** *Physiol Genomics* 2009, **39:219-226.**
- 503 26. Perrin L, Loizides-Mangold U, Skarupelova S, Pulimeno P, Chanon S, Robert M,  
504 Bouzakri K, Modoux C, Roux-Lombard P, Vidal H, et al: **Human skeletal**  
505 **myotubes display a cell-autonomous circadian clock implicated in basal**  
506 **myokine secretion.** *Molecular Metabolism* in press.
- 507 27. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A,  
508 Speleman F: **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data**  
509 **by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biol* 2002,  
510 **3:RESEARCH0034.** Epub 2002 Jun 0018.

- 511 28. Team RDC: **R: A language and environment for statistical computing. R**  
512 **Foundation for Statistical Computing.** Vienna, Austria: R Foundation for  
513 Statistical Computing; 2008.
- 514 29. Vlachos IS, Kostoulas N, Vergoulis T, Georgakilas G, Reczko M, Maragkakis M,  
515 Paraskevopoulou MD, Prionidis K, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG: **DIANA**  
516 **miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in**  
517 **pathways.** *Nucleic Acids Res* 2012, **40**:W498-504. doi: 410.1093/nar/gks1494.  
518 Epub 2012 May 1030.
- 519 30. Cimino D, De Pitta C, Orso F, Zampini M, Casara S, Penna E, Quaglino E, Forni M,  
520 Damasco C, Pinatel E, et al: **miR148b is a major coordinator of breast cancer**  
521 **progression in a relapse-associated microRNA signature by targeting**  
522 **ITGA5, ROCK1, PIK3CA, NRAS, and CSF1.** *Faseb J* 2013, **27**:1223-1235.
- 523 31. Wang G, Cao X, Lai S, Luo X, Feng Y, Wu J, Ning Q, Xia X, Wang J, Gong J, Hu J:  
524 **Altered p53 regulation of miR-148b and p55PIK contributes to tumor**  
525 **progression in colorectal cancer.** *Oncogene* 2015, **34**:912-921.
- 526 32. Zhao G, Zhang JG, Liu Y, Qin Q, Wang B, Tian K, Liu L, Li X, Niu Y, Deng SC, Wang  
527 CY: **miR-148b functions as a tumor suppressor in pancreatic cancer by**  
528 **targeting AMPKalpha1.** *Mol Cancer Ther* 2013, **12**:83-93.
- 529 33. Zhang JG, Shi Y, Hong DF, Song M, Huang D, Wang CY, Zhao G: **MiR-148b**  
530 **suppresses cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma by**  
531 **targeting WNT1/beta-catenin pathway.** *Sci Rep* 2015, **5**.
- 532 34. Wu Y, Liu GL, Liu SH, Wang CX, Xu YL, Ying Y, Mao P: **MicroRNA-148b enhances**  
533 **the radiosensitivity of non-Hodgkin's Lymphoma cells by.** *J Radiat Res* 2012,  
534 **53**:516-525.
- 535 35. Lee DH, Shi J, Jeoung NH, Kim MS, Zabolotny JM, Lee SW, White MF, Wei L, Kim  
536 YB: **Targeted disruption of ROCK1 causes insulin resistance in vivo.** *J Biol*  
537 *Chem* 2009, **284**:11776-11780.
- 538 36. Chun KH, Araki K, Jee Y, Lee DH, Oh BC, Huang H, Park KS, Lee SW, Zabolotny JM,  
539 Kim YB: **Regulation of glucose transport by ROCK1 differs from that of**  
540 **ROCK2 and is controlled by actin polymerization.** *Endocrinology* 2012,  
541 **153**:1649-1662.
- 542 37. Bischoff A, Bayerlova M, Strotbek M, Schmid S, Beissbarth T, Olayioye MA: **A**  
543 **global microRNA screen identifies regulators of the ErbB receptor signaling**  
544 **network.** *Cell Commun Signal* 2015, **13**:doi:10.1186/s12964-12015-10084-z.
- 545 38. Peng H, Cao J, Yu R, Danesh F, Wang Y, Mitch WE, Xu J, Hu Z: **CKD Stimulates**  
546 **Muscle Protein Loss Via Rho-associated Protein Kinase 1 Activation.** *J Am*  
547 *Soc Nephrol* 2015, **8**:2014121208.
- 548 39. Chun KH, Choi KD, Lee DH, Jung Y, Henry RR, Ciaraldi TP, Kim YB: **In vivo**  
549 **activation of ROCK1 by insulin is impaired in skeletal muscle of humans**  
550 **with type 2 diabetes.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011, **300**:536-542.
- 551  
552



553 **FIGURES**

554

555 **Figure 1.** Timeline experiments. Grey blocks represent periods where A) men were active  
556 and B) mice had access to wheels, and white blocks where A) men were inactive and B)  
557 wheels have been locked. A) Active men followed detraining during 4 weeks, while inactive  
558 men followed 8-weeks of training. B) Compared to non-exercise (SED), exercise mice (EX)  
559 continue running throughout the experiment, while the exercise followed by 2-weeks (WL2)  
560 and 4-weeks (WL4) detrained mice stop running at 18 weeks of age.

561

**Figure 2.** Increase of miR-148b muscle expression with inactivity transition. Muscle  
expression of miR-148b in A) active (n=6) and inactive (n=6) men before and after one month  
of detraining and two months of training at current recommendations; B) in SED (n=6), EX  
(n=7), WL2 (n=7) and WL4 (n=7) mice assessed by qRT-PCR. \* P<0.05 vs active or EX  
mice; † P<0.05 vs active lean. Values are means ± SEM.

**Figure 3.** NRAS and ROCK1 are miR-148b target genes in human primary cells. Human  
primary differentiated myotubes were transfected with inhibitor against miR-148b (I) or  
control inhibitor (Ci), as well as miR-148b plasmid expression (P) or control plasmid (Cp),  
and content in NRAS and ROCK1 proteins was assessed by western-blotting. Results are  
presented as fold change vs control after miR-148b inhibition or overexpression. \* P<0.05 vs  
Control. Values are means ± SEM for n=6 experiments.

562 **Figure 4.** Increase of miR-148b in muscle cell alters insulin response. Human primary  
563 myotubes were transfected with inhibitor against miR-148b (I) or control inhibitor (Ci), as  
564 well as miR-148b plasmid expression (P) or control plasmid (Cp), and phosphorylation of

565 PKB and MAPK in response to 10 $\mu$ M and 100 $\mu$ M insulin was assessed by western-blotting.  
566 Results are presented as fold change in NRAS (A-B) and ROCK1 (C-D) proteins after  
567 inhibition (A-C) or overexpression (B-D). \* P<0.05 vs Control. Values are means  $\pm$  SEM for  
568 n=6 experiments.

569 **Figure 5.** Consequences of miR-148b changes in detraining transition. A) Mouse  
570 *Gastrocnemius* content in NRAS and ROCK1 proteins in EX (n=7) and WL2 (n=6) animals  
571 assessed by western-blotting. \* P<0.05 vs EX mice. Values are means  $\pm$  SEM. B)  
572 Relationships between the changes in fasting insulinemia (ng/mL) and the changes in muscle  
573 miR-148b content during sedentary (n=6) or active transition (n=6).

574 **Table 1.** Characteristics of the participants before and after interventions on physical activity<sup>1</sup>  
 575

Intervention	Active men		Inactive men	
	Detraining		Training	
	Before n=9	After n=7	Before n=7	After n=7
<b>Anthropometric measures</b>				
Age (years)	24.9±0.8		25.0±0.7	
BW (kg)	71.3±1.4	70.2±1.7	78.7±1.1	78.4±1.1
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.1±0.3	22.4±0.3	23.8±0.3	23.6±0.3
FFM (kg)	60.4±1.2	58.4±1.4*	61.6±0.8	61.5±0.7
<b>Physical activity outcomes</b>				
VO <sub>2 peak</sub> (ml.min <sup>-1</sup> .kg <sup>-1</sup> )	49.4±1.0	46.2±0.9*	39.9±0.7†	43.5±0.9*
AEE (Kj/d/kg)	83.7±3.7	74.3±3.2*	33.0±2.8†	52.5±3.8*

<sup>1</sup>Abbreviations: AEE, activity energy expenditure; BMI, body mass index; BW, body weight; VO<sub>2 peak</sub>, peak oxygen uptake. All values are means ± SEMs. \* P<0.05 compared with baseline, † P<0.01 compared with active men at baseline

576 **Table 2.** Characteristics of mice by week 18 prior interventions on physical activity and at sacrifice<sup>1</sup>  
 577  
 578

Variables	SED n=6	EX n=7	WL2 n=7	WL4 n=7
<b>At week 18</b>				
BW (g)	27.0 ± 0.7	26.9 ± 0.8	27.7 ± 0.9	27.2 ± 0.7
Mean running distance from week 15 to 18 (m/day)	-	5665 ± 262	5473 ± 473	5815 ± 814
Food intake (g/day)	3.5 ± 0.1*	4.1 ± 0.1	3.9 ± 0.1	4.1 ± 0.1
<b>At sacrifice</b>				
BW (g)	28.7 ± 0.6	29.0 ± 0.5	28.5 ± 1.1	30.2 ± 0.9
Mean running distance from week 18 to 22 (m/day)	-	4144 ± 407	-	-
<i>Gastrocnemius lateralis</i> /BW (%)	147.7 ± 2.4	153.0 ± 3.4	150.0 ± 2.3	150.0 ± 3.9

<sup>1</sup>Running distance and food intake were recorded per cage, which contained one mouse. Abbreviations: BW, body weight; EX, exercise; WL2, exercise followed by 2-weeks detraining; WL4, exercise followed by 4-weeks detraining, SED, no exercise. All values are means ± SEMs. \* P<0.05 compared with running mice (EX, WL2 and WL4).

579 **Table 3.** List of differentially expressed circulating miRNAs between active and inactive group before  
 580  
 581  
 582  
 583

miRNAs	fold	pvalue
has-miR-155	75.57	0.011
hsa-miR-128	4.00	0.033
hsa-miR-142-5p	12.16	0.019
hsa-miR-148b	4.65	0.027
hsa-miR-151-3p	325.79	0.019
hsa-miR-152	7.21	0.033
hsa-miR-16-1*	10.97	0.025
hsa-miR-199b-5p	4.79	0.025
hsa-miR-19a	3.42	0.033

hsa-miR-21	2.83	0.033
hsa-miR-223	2.33	0.033
hsa-miR-27a	2.99	0.033
hsa-miR-324-3p	22.67	0.011
hsa-miR-33a*	3.12	0.019
hsa-miR-345	23.00	0.033
hsa-miR-424*	8.91	0.043
hsa-miR-505	2.97	0.025
hsa-miR-590-5p	3.32	0.019
hsa-miR-601	39.87	0.027
hsa-miR-660	6.47	0.033
hsa-miR-661	19.68	0.025
hsa-miR-744	8.37	0.019
hsa-miR-769-5p	5.69	0.011
hsa-miR-9*	23.09	0.019
hsa-miR-93	3.60	0.033
hsa-miR-942	56.24	0.019

584 <sup>†</sup>Fold: changes in miRNAs expression in inactive  
585 group compared to active group

586  
587

588 **SUPPLEMENTAL DATA**

589 **S1.** References of TLDA products.

590

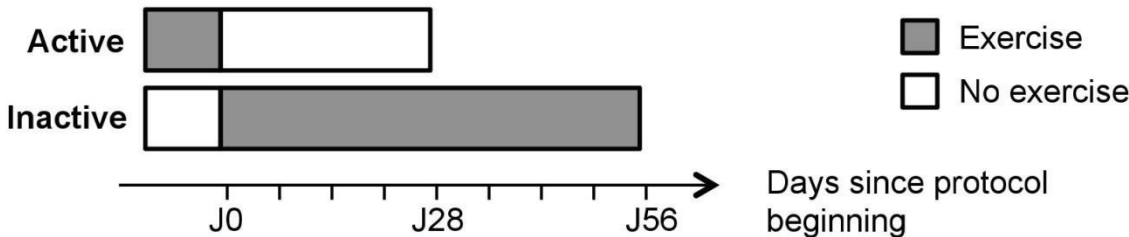
<b>Type</b>	<b>Name</b>	<b>Reference</b>
Array	TaqMan Human miRNA Array A + B	4400238
Mix	TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG	4324018
Mix	TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, 200 Reactions	4366596
Mix	TaqMan PreAmp Master Mix Kit	4384267
Primers	Megaplex PreAmp Primers, Human Pool Set v2.0	4400927
Primers	Megaplex RT Primers, Human Pool Set v2.0	4400928

591

592

593

**A - Human**



**B - Mouse**

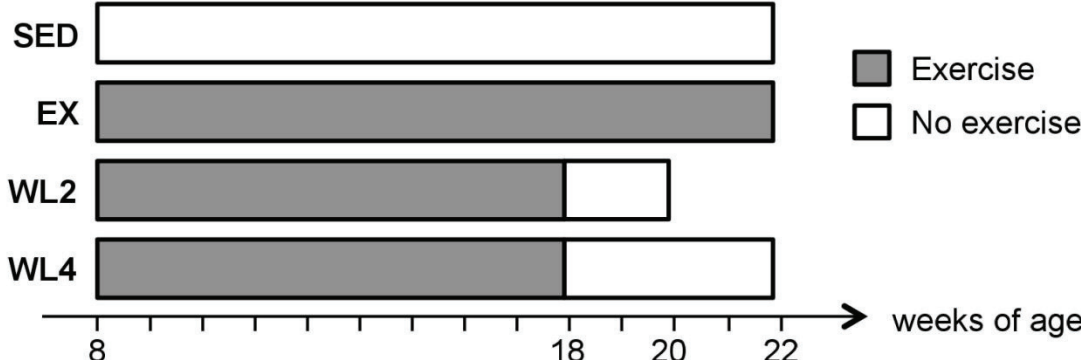
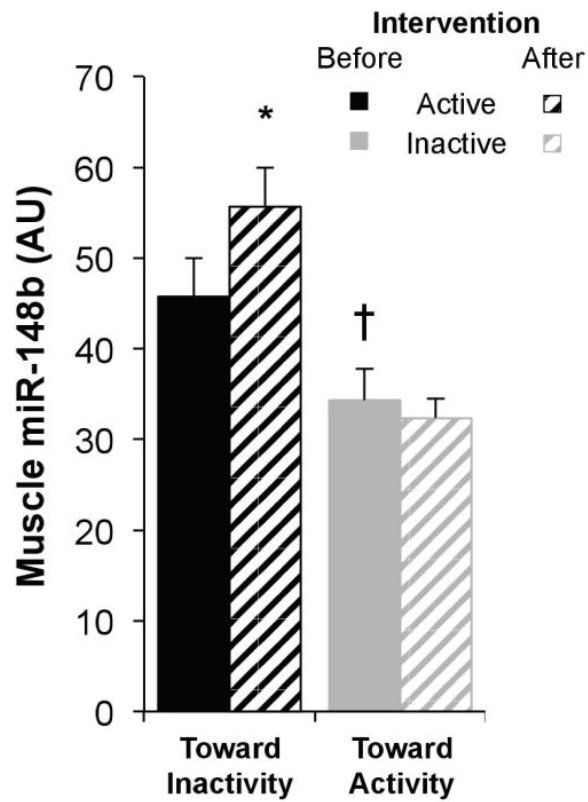
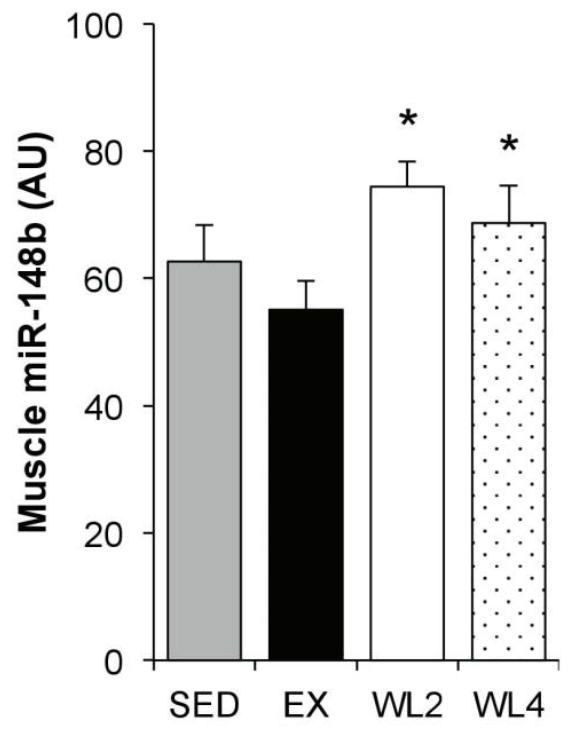


Figure 1

### A - Human



### B - Mouse



\*  $P < 0.05$  vs before or exercise mice

Figure 2

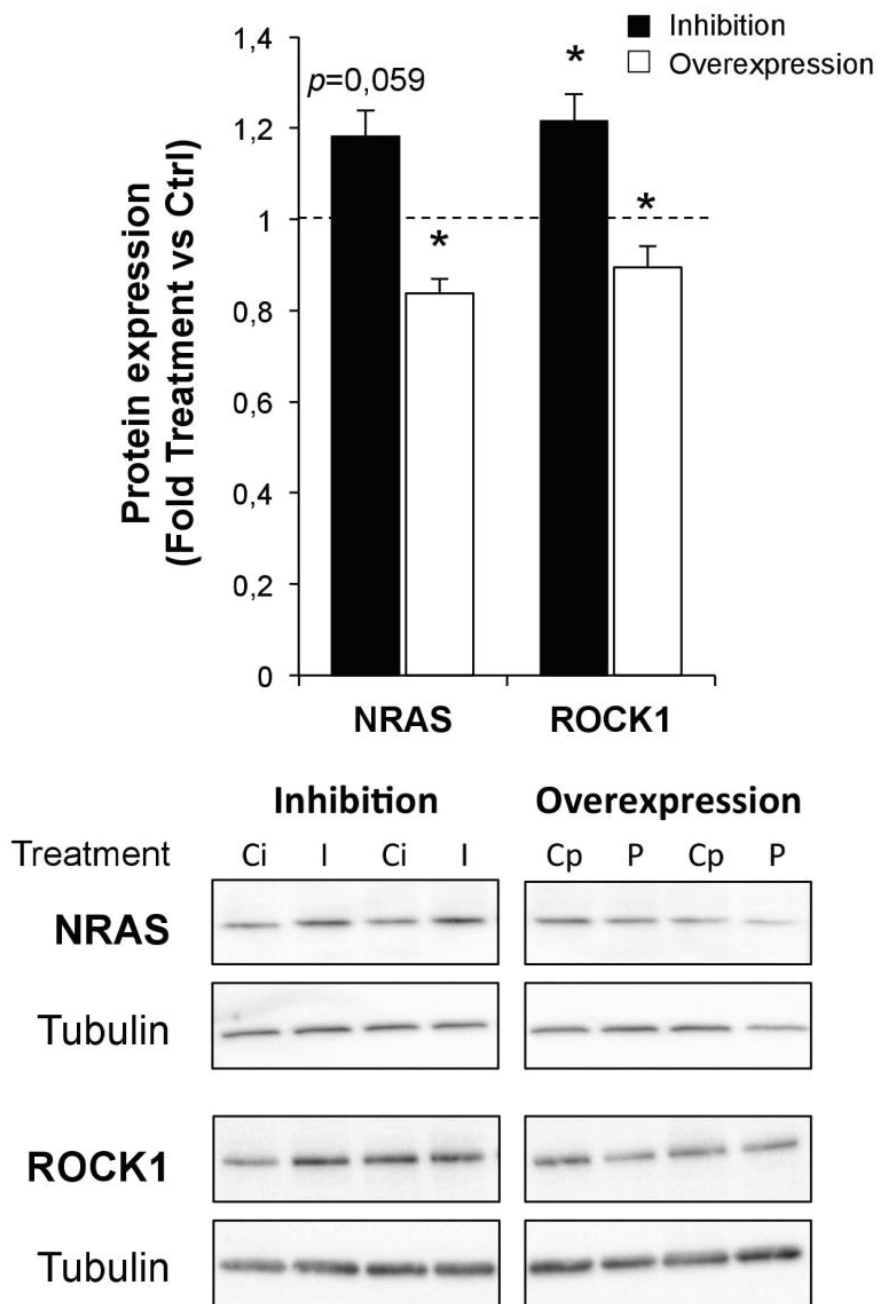


Figure 3

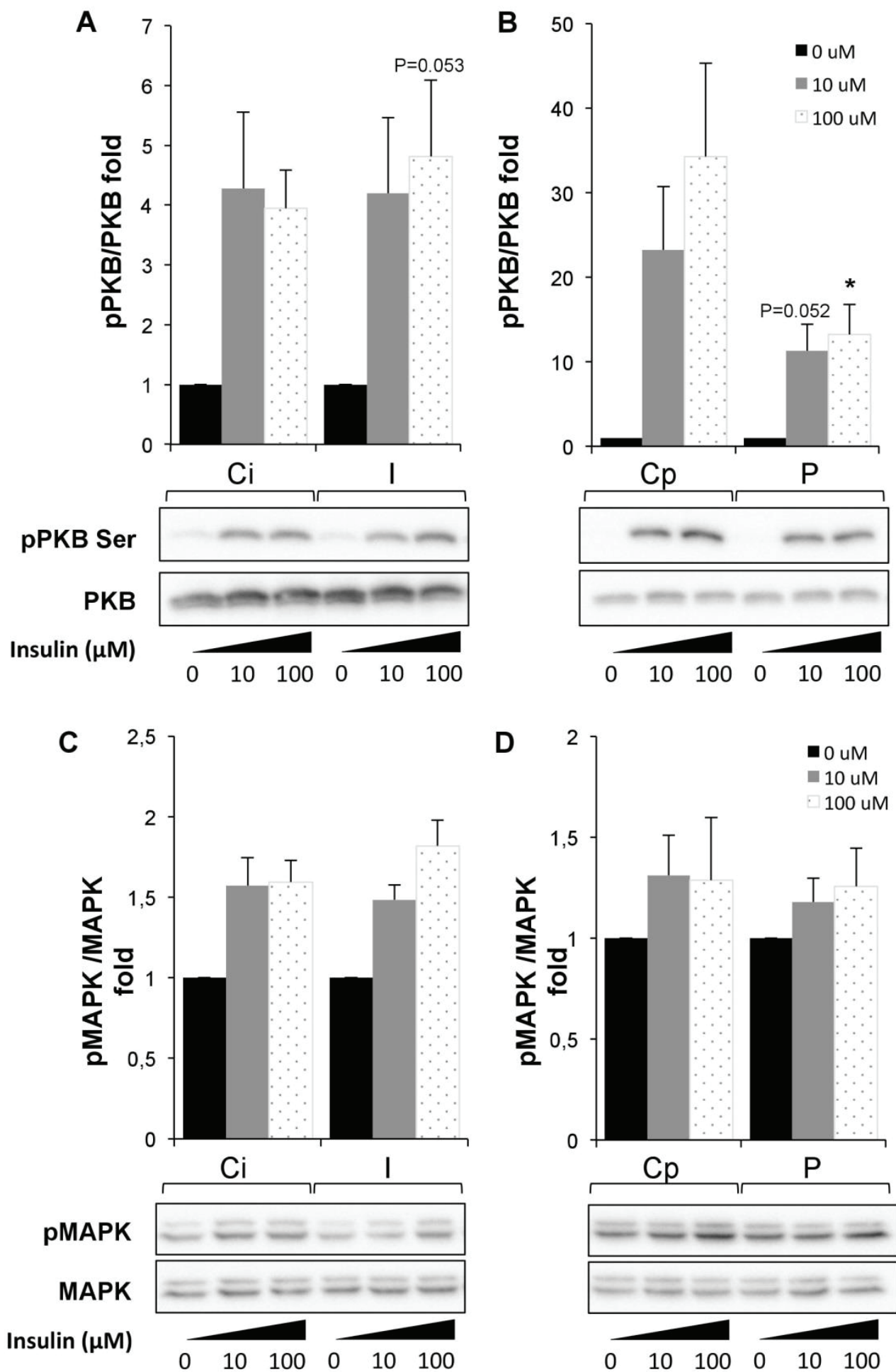
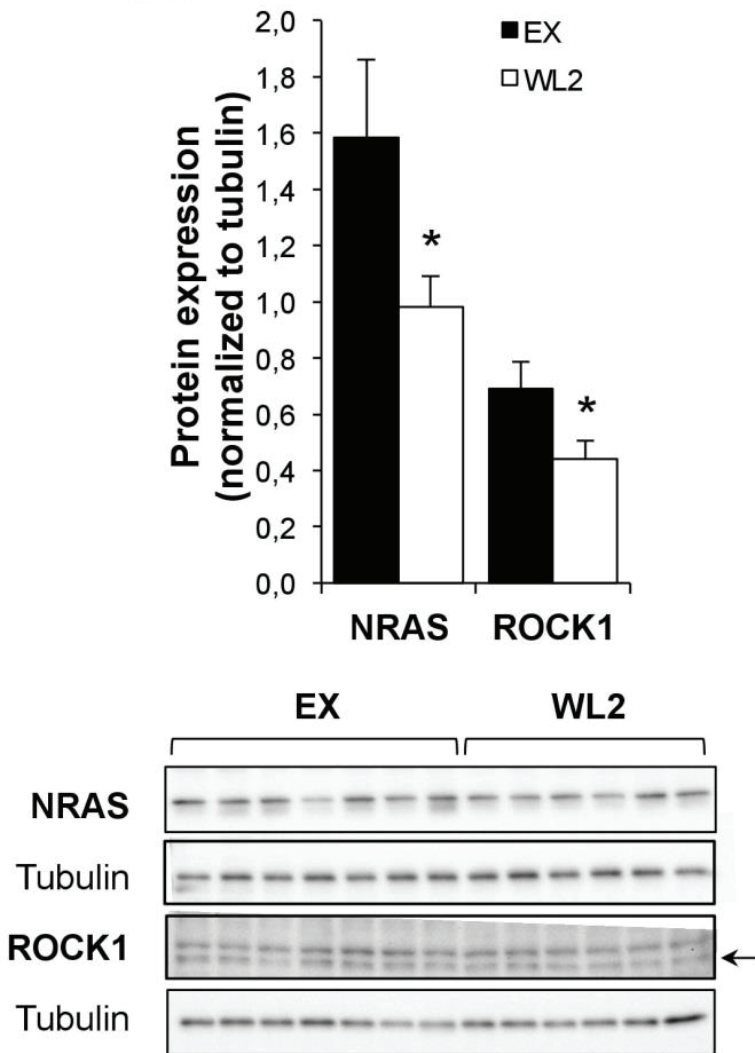


Figure 4



### A - Mouse



### B - Human

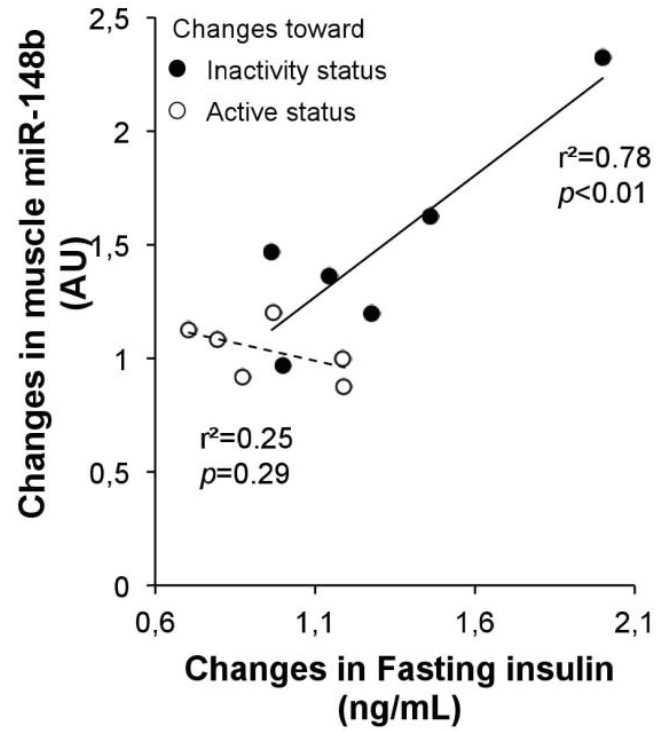


Figure 5





## DISCUSSION



Les effets bénéfiques de l'activité physique sur la santé sont un fait établi depuis longtemps mais concernaient jusqu'à présent surtout les effets de l'exercice. Au-delà des effets sur le métabolisme musculaire ou énergétique global, l'activité physique a également des effets métaboliques systémiques, cardiovasculaires, anti-inflammatoires ou encore antioxydants, mettant en évidence l'implication d'autres tissus que le muscle. Les effets bénéfiques de l'activité physique, et délétères de l'inactivité physique, ayant des effets à l'échelle corps entier et impliquant de façon coordonnée plusieurs organes, suggère l'existence d'un dialogue inter-organe également appelé cross-talk, permettant l'intégration au niveau global des signaux positifs ou négatifs issus de l'activité physique.

Dans ce travail de thèse, je me suis ainsi intéressée à un panel large d'activité physique, incluant l'exercice mais également l'activité physique quotidienne au sens large. J'ai ainsi examiné les effets de l'activité et inactivité physique modérée et inactivité extrême sur le métabolisme du foie, et du muscle et sur deux acteurs du cross-talk, l'adiponectine et les microARNs.

#### A. Activité/inactivité physique et sensibilité à l'insuline

Les effets de la pratique régulière d'activité physique sur la sensibilité globale de l'organisme à l'insuline sont bien établis. Elle est associée avec l'expression et l'activité de nombreuses protéines clés du métabolisme dans le muscle squelettique, telles que PGC-1 $\alpha$  et l'AMPK (Goodyear 2000). A l'inverse, l'inactivité physique sévère induite dans les études de bed-rest conduit au développement d'une résistance à l'insuline dans les tissus sensibles à l'insuline, notamment le muscle (Mikines et al. 1989), puis généralisée à l'échelle du corps entier (Bergouignan et al. 2011).

Au cours de cette thèse, nous avons eu l'opportunité d'étudier l'effet de différents niveaux d'activité, de l'inactivité extrême dans le protocole de bed-rest à modérée dans le protocole LIPOX, et l'activité physique de type aérobie et de résistance en contre-mesure du bed-rest, et de type aérobie et l'activité physique quotidienne dans l'étude LIPOX, sur l'insulinémie chez des sujets en bonne santé, dans des conditions où la balance énergétique des sujets a été maintenue stable.

Comme attendu, l'entraînement physique de type aérobie réalisé sur 8 semaines dans le protocole LIPOX a diminué l'insulinémie à jeun et l'indice HOMA-IR, témoignant d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline chez les sujets

initialement inactifs. Et à l'inverse, l'alitement prolongé et le désentraînement sur 4 semaines ont augmenté l'insulinémie à jeun et l'indice HOMA-IR, mettant en évidence une altération de la sensibilité à l'insuline. De plus l'exercice en contre-mesure du bed-rest a permis de prévenir au moins partiellement le développement de la résistance à l'insuline.

Dans ce contexte, j'ai examiné l'implication potentielle de deux acteurs, dans ces effets de l'activité physique sur la sensibilité à l'insuline : l'adiponectine et les microARNs.

### *1. Implication de l'adiponectine dans les effets de l'activité/inactivité physique sur l'insuline*

L'adiponectine est une hormone du tissu adipeux inversement associée avec l'obésité, pouvant corriger partiellement la résistance à l'insuline associée à l'obésité (Yamauchi et al. 2001), et offrir une prévention vis-à-vis du diabète de type 2 (Yamauchi et al. 2003a). On peut supposer que les effets insulino-sensibilisateurs de l'activité physique pourraient ainsi impliquer l'adiponectine, un acteur du cross-talk.

Les effets de l'activité physique sur l'adiponectine présentent cependant des résultats contradictoires dans la littérature. Ainsi, il a été montré que l'exercice augmente, diminue ou ne change pas les concentrations circulantes d'adiponectine (Simpson and Singh 2008; Bouassida et al. 2010; Golbidi and Laher 2014; Hayashino et al. 2014). Comme nous l'avons présenté dans l'introduction, les variations de masse grasse induites par l'entraînement physique lors des interventions peuvent empêcher ou primer sur l'effet *per se* de l'exercice sur les concentrations plasmatiques d'adiponectine. Dans cette thèse, nous avons examiné, indépendamment des effets de l'exercice sur le poids corporel et la masse grasse que nous avons maintenus stables, les effets d'un changement du niveau d'activité, entraînement et désentraînement, sur l'adiponectine plasmatique chez des adultes de sexe masculin normo-pondérés et en surpoids. Dans ces conditions contrôlées, nous avons pu montrer que les concentrations d'adiponectine diminuaient avec l'entraînement physique de type aérobie de 8 semaines et augmentaient avec le désentraînement de 4 semaines. Ces résultats sont renforcés par le fait que malgré un IMC similaire et une plus faible masse grasse, les sujets actifs présentaient des taux circulants d'adiponectine inférieurs à leur homologue inactifs ; même si l'adiponectine plasmatique, inversement corrélée à la masse grasse dans la

littérature (Arita et al. 1999), était comme attendu plus basse chez les sujets inactifs en surpoids en comparaison de leur homologue inactifs normo-pondérés. Quelques études montrent, de façon concordante avec nos résultats, une diminution des taux plasmatiques d'adiponectine avec l'entraînement de type aérobie (Van Berendoncks et al. 2011) ou en résistance (Ibanez et al. 2010). D'après les niveaux d'expression de l'adiponectine dans le tissu adipeux et musculaire, nos résultats ne semblent pas être expliqués par des variations dans la synthèse d'adiponectine. De façon similaire, les quelques rares études qui ont examiné l'expression du gène d'adiponectine en réponse à l'activité physique induite ne montrent pas de variation ou une augmentation de l'expression du gène d'adiponectine associée à une perte de masse grasse (Polak et al. 2006; Lee et al. 2011).

La clairance de l'adiponectine secondaire à la captation par les organes périphériques représente un autre mécanisme potentiel susceptible de contribuer aux changements de concentrations de l'adiponectine dans la circulation.

La clairance de l'adiponectine semble dépendre de l'activité de l'adiponectine, avec une clairance plus rapide lorsque l'adiponectine est plus fortement active (Halberg et al. 2009). L'adiponectine est présente sous différentes formes multimériques dans la circulation (du fait de ses modifications post-translationnelles) : une forme trimérique LMW, une forme hexamérique MMW et une forme multimérique HMW (Schraw et al. 2008) ; cette dernière étant considérée comme la forme la plus active avec une association plus forte avec la sensibilité à l'insuline que les concentrations d'adiponectine totale (Hara et al. 2006). Il a de fait été montré que l'exercice affecte la clairance de l'adiponectine et augmente la captation de l'adiponectine par les tissus oxydatifs avec un effet préférentiel pour la forme HMW (Rutkowski et al. 2014). De façon intéressante dans une étude randomisée comparant les effets d'une perte de poids induite par l'entraînement en endurance, ou par contrôle du régime alimentaire, et les effets de l'entraînement par endurance sans perte de poids chez des hommes en léger surpoids (Auerbach et al. 2013), alors que l'adiponectine totale ne varie pas dans ces différentes interventions, il y a une modification dans la distribution multimérique de l'adiponectine dans les groupes entraînés. Indépendamment de l'amplitude de la perte de poids, l'entraînement par endurance était associé avec une modification en faveur de la forme LMW et une diminution de 21% du ratio HMW/LMW, suggérant



également une clairance augmentée de la forme active. Dans notre étude, nous avons mesuré les différentes formes d'adiponectine circulante en réponse à l'entraînement et le désentraînement, à l'aide de différents kits ELISA. De façon similaire à l'étude d'Auerbach et al. (2013), nous montrons que la distribution multimérique de l'adiponectine circulante est modifiée avec le niveau d'activité, l'adiponectine HMW étant en revanche la seule forme variant selon les groupes et en réponse à l'intervention et expliquant ainsi les variations de concentrations plasmatiques d'adiponectine totale induites par les interventions.

La captation de l'adiponectine peut aussi dépendre de la masse musculaire, comme une étude précédente a montré que l'expression des récepteurs adipoR1 et adipoR2 étaient positivement associée avec le masse musculaire lors d'un protocole de stimulation du muscle chez la souris (Goto et al. 2013). Cependant, l'expression des récepteurs à l'adiponectine dans le muscle dans notre étude n'était pas associée avec la masse musculaire.

La diminution d'adiponectine en réponse à l'exercice, de façon concomitante avec une diminution des niveaux plasmatiques d'insuline à jeun, et de l'oxydation lipidique totale ( $p < 0,01$ ), dans notre étude et celle d'Ibanez et al. (2010), peut sembler contre-intuitive étant donné que l'adiponectine augmente la sensibilité à l'insuline et l'oxydation des lipides, et qu'elle est globalement associée avec des effets bénéfiques pour la santé. Ces résultats peuvent s'expliquer par une augmentation de la sensibilité à l'adiponectine, notamment dans le muscle squelettique.

Il a été montré que des patients présentant une altération chronique du cœur et une très faible capacité cardiorespiratoire avaient des concentrations plasmatiques élevées d'adiponectine associées à une résistance à l'adiponectine au niveau du muscle squelettique (Van Berendoncks et al. 2010). Dans le muscle, l'expression du gène d'adipoR1 chez ces patients est notamment diminuée et associée fortement avec la capacité maximale d'exercice (Van Berendoncks et al. 2011). De plus, 4 mois d'entraînement combinant exercice en endurance et en résistance chez ces patients, ont diminué les concentrations plasmatiques d'adiponectine, et ont normalisé l'expression musculaire du récepteur adipoR1 et de gènes effecteurs de l'adiponectine (Van Berendoncks et al. 2011). Par ailleurs, l'effet insulino-sensibilisateur de l'adiponectine en réponse à l'exercice chez des souris rendues obèses par un régime hypercalorique est, en partie, expliqué par l'augmentation de l'expression des récepteurs adipoR1 et adipoR2 (Farias et al.

2012; Marinho et al. 2012) et de son effecteur l'APPL1 (Mao et al. 2006; Marinho et al. 2012). Dans notre étude, la relation inverse entre les concentrations plasmatiques d'insuline à jeun avec les niveaux d'expression musculaires des deux récepteurs et d'APPL1 supporte ainsi une augmentation de la sensibilité à l'adiponectine avec l'exercice. De façon intéressante nous avons également trouvé des associations positives entre les récepteurs de l'adiponectine AdipoR1 et AdipoR2, APPL1 et la capacité cardiorespiratoire ( $VO_{2max}$ ).

Nous avons par ailleurs trouvé des corrélations entre les changements du niveau d'expression musculaire (ARN) des récepteurs à l'adiponectine, AdipoR1 et AdipoR2, et ceux des gènes PRKAA2 (protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit), CPT1 (Carnitine palmitotransférase 1), PGC1 $\alpha$  et SPTLC1 (Serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 1) ( $p < 0,05$ ), en réponse à la modulation du niveau d'activité physique (résultats non présentés dans le papier soumis). Une partie des effets bénéfiques de l'adiponectine s'expliquant par l'activation de l'AMPK dans le muscle, la corrélation entre les changements d'expression de PRKAA2, qui est une isoforme de la sous-unité catalytique de l'AMPK, et ceux des récepteurs dans le muscle suggère ainsi une plus grande activation de la voie AMPK par l'adiponectine en réponse à l'activité physique. De plus, l'activation de l'AMPK stimule, via l'inhibition d'ACC, CPT1 qui favorise l'oxydation des acides gras dans le muscle et le foie (Lafontan and Viguierie 2006). Dans notre étude, l'amélioration de la sensibilité à l'adiponectine, en réponse à l'exercice, est également suggérée par les corrélations entre les récepteurs à l'adiponectine et PGC1 $\alpha$  ( $p < 0,001$ ), un facteur de transcription impliqué dans le métabolisme des acides gras, et avec SPTLC1 ( $p < 0,05$ ) impliqué dans la voie des sphingolipides et des céramides, via l'activation de l'AMPK par l'adiponectine (Holland et al. 2011). Ces résultats supportent également l'hypothèse d'une amélioration de la sensibilité à l'adiponectine avec l'exercice. L'analyse des échantillons de LIPOX étant rétrospective et en l'absence de matériel tissulaire suffisant, nous n'avons pas pu confirmer ces résultats au niveau de l'expression protéique de ces effecteurs de la signalisation de l'adiponectine.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'activité physique diminue les taux circulants d'adiponectine totale, principalement par une diminution de sa forme active HMW, probablement du fait d'une augmentation de sa clairance et de la sensibilité musculaire à l'adiponectine, qui pourrait contribuer à une augmentation

de la sensibilité à l'insuline au niveau du muscle squelettique. A l'inverse l'effet insulino-résistant de l'inactivité physique peut ainsi impliquer une résistance à l'adiponectine musculaire. Cette étude sur l'adiponectine, une hormone sécrétée par le tissu adipeux, souligne son rôle potentiel d'acteur du cross-talk dans les effets de l'activité et inactivité physique sur la santé, notamment sur l'insuline. Ceci doit cependant être vérifié par des études complémentaires notamment protéomiques.

## *2. Implication des microARNs dans les effets de l'inactivité physique sur l'insuline*

La caractérisation d'évènements moléculaires clés se produisant dans le muscle squelettique pendant les stades précoces de transition de l'activité vers l'inactivité comme le développement de la résistance à l'insuline est d'un intérêt majeur. Parmi les nombreux facteurs musculaires qui sont régulés par l'activité physique, outre l'adiponectine, notre étude s'est également intéressée à l'implication des microARNs, d'importants régulateurs de l'expression des gènes, dans les mécanismes sous-jacents de l'activité physique et inactivité, principalement au niveau musculaire.

L'étude rétrospective des échantillons du protocole LIPOX où les niveaux d'activité physique sont bien caractérisés et la balance énergétique a été maintenue stable a montré des différences dans les niveaux circulants de certains microARNs. Parmi ceux-ci, nous avons focalisé notre étude sur miR-148b, un microARN dont certaines des cibles prédites ou validées sont impliquées dans des voies de signalisation associées à l'insuline (sécrétion, transduction du signal, etc...).

Ainsi, dans cette étude, nous avons montré que l'inactivité physique induite augmente l'expression de miR-148b dans le muscle chez l'homme (4 semaines de désentraînement) et la souris (2 ou 4 semaine d'arrêt de l'exercice spontané), alors que l'entraînement physique (8 semaines d'exercice aérobie chez l'homme) n'induit pas de diminution de miR-148b dans le muscle. De façon similaire à l'inactivité modérée, l'immobilisation du muscle peut également augmenter l'expression de miR-148b comme observé dans le muscle soléaire chez des rats après 7 jours de suspension par l'arrière-train (McCarthy et al. 2009). En revanche, il faut noter que Rezen et al. (2014) ont observé une diminution de l'expression de miR-148b dans le muscle chez des sujets adultes de sexe masculin suite à un protocole de type bed-rest de 10 jours. Cette discordance de résultats peut s'expliquer soit par des

différences d'intensité de l'inactivité physique qui est plus sévère dans le bed-rest, soit par des différences dans la durée des protocoles (10 jours contre 28 jours dans notre protocole). En fait, nos modèles reflètent plus les comportements inactifs de la vie de tous les jours par comparaison aux conditions expérimentales extrêmes d'un bed-rest. De plus l'intensité n'étant pas la même, les altérations induites dans le protocole de bed-rest peuvent être plus avancées, les voies de régulation de l'expression des gènes alors mises en jeu n'étant peut-être plus les mêmes.

L'exploration *in vitro* dans des myotubes humains différenciés, montre que la modulation de l'activité de miR-148b, soit par surexpression de miR-148b soit par répression de son activité, induit des changements dans l'expression protéique de deux cibles NRAS (Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog) et ROCK1 (Rho-Associated, Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1), deux protéines dont l'implication dans les voies de l'insuline et du glucose a été montrée dans de nombreux types de cancers (Cimino et al. 2013; Zhao et al. 2013; Wang et al. 2015b). La surexpression de miR-148b diminue ainsi les niveaux d'expression protéiques de ces deux cibles dans des cellules musculaires différenciées, alors que l'inhibition de mir-148b induit des effets opposés. De façon intéressante, nous avons montré que seule la surexpression de miR-148b dans ce modèle avait un effet sur la réponse à l'insuline dans les myotubes humains différenciés. En effet, la phosphorylation de la protéine kinase B Akt/PKB est altérée de façon concomitante avec la diminution des protéines NRAS et ROCK1 induite par la surexpression de mir-148b. En revanche, bien que les protéines NRAS et ROCK1 soient augmentées par l'inhibition de miR-148b, la phosphorylation d'Akt/PKB n'est pas stimulée. Bischoff *et al.* (2015) ont également montré que miR-148b affectait la voie PI3K-Akt en diminuant l'expression du récepteur ErbB3.

Dans la lignée de ces résultats, nous avons montré que les protéines NRAS et ROCK1 étaient diminuées lors de l'arrêt de l'exercice spontané chez la souris, de façon concomitante avec l'augmentation de miR-148b. De façon intéressante, Lee et al. (2009) ont montré qu'une déficience en protéine ROCK1 conduit à une résistance à l'insuline en altérant la signalisation de l'insuline dans le muscle squelettique de souris. De plus, le rôle important de ROCK1 comme régulateur positif de l'action de l'insuline sur le transport du glucose a été montré dans les adipocytes et les cellules musculaires (Chun et al. 2012). Par ailleurs, Chun et al. (2011) ont montré une altération de l'activité de ROCK1 en réponse à l'insuline dans le muscle de sujets obèses avec un diabète de type 2, sans changement des

niveaux protéiques de ROCK1, soulignant le rôle de ROCK1 dans le développement et le maintien de la résistance à l'insuline, induisant un défaut d'utilisation du glucose par le muscle.

Dans cette étude, nous avons également montré que l'augmentation de l'expression de miR-148b dans le muscle pendant la transition vers l'inactivité semble être positivement associée au changement de l'insulinémie à jeun et l'indice HOMA-IR. Les données disponibles supportant cette hypothèse étant réduites, l'exploration d'une cohorte plus large est nécessaire pour mieux caractériser l'implication de miR-148b sur la sensibilité à l'insuline à l'échelle du corps entier.

Nos données supportent l'hypothèse globale que la phase précoce de transition vers l'inactivité physique provoque une augmentation de l'expression de miR-148b dans le muscle induisant des changements spécifiques aigus dans le métabolisme musculaire, et pourrait alors participer à la dégradation de la sensibilité à l'insuline au niveau du corps entier puis à l'installation de désordres métaboliques lorsque les comportements inactifs persistent.

Nous avons vu que différents niveaux d'activité, de l'inactivité extrême à l'activité physique modérée, peuvent moduler l'insulinémie. L'ensemble des résultats obtenus dans ces différentes études montre que les effets de l'activité et inactivité physique sur l'insuline impliquent des acteurs au niveau du muscle, les microARNs, mais également le tissu adipeux qui par la sécrétion d'adiponectine intervient dans la médiation de ces effets. Les microARNs pouvant être sécrétés dans la circulation, on peut supposer que certains participent également à la communication entre les organes permettant une synchronisation des effets à l'échelle corps entier.

Nous avons choisi d'examiner plus en détail l'implication de miR-148b dans les mécanismes associés à l'activité et l'inactivité physique, mais d'autres microARNs présentaient également des associations entre leurs niveaux circulants et des paramètres liés à l'activité physique, tels que miR-21, miR-133a, miR-26a avec la dépense énergétique liée à l'activité physique, ou miR-21 et miR-133a avec l'oxydation du palmitate. Ces associations avec d'autres paramètres liés à l'activité physique suggèrent que ces microARNs peuvent également avoir un rôle dans la réponse au niveau d'activité physique. Ces trois microARNs sont notamment connus pour être des myomiRs, des microARNs spécifiques du muscle (Zacharewicz et al. 2013). Des études ont ainsi montré l'implication de miR-26a et miR-133a dans les mécanismes anaboliques du muscle (Drummond et al. 2008) et

l'implication de miR-21 dans le développement cérébral et neuronal en réponse à l'exercice, via l'activation de la voie des voies de signalisation PTEN/(Liu et al. 2012; Miao et al. 2015). L'association des taux circulants de miR-21 avec l'oxydation du palmitate est également appuyée par des études qui ont montré son rôle dans le métabolisme des lipides (Yang et al. 2015).

Au-delà du rôle de miR-148b dans la voie de signalisation de l'insuline, d'autres microARNs peuvent donc ainsi être impliqués dans les mécanismes mis en place en réponse au niveau d'activité physique, des pistes qui nécessitent donc d'être approfondies.

## B. Activité/inactivité physique, oxydation lipidique et lipides circulants

L'inactivité physique est associée au développement d'une hyperlipidémie caractérisée par une augmentation des triglycérides plasmatiques (HHS 1996; Bergouignan et al. 2013). Par ailleurs, il a été montré que des sujets considérés comme actifs avaient une meilleure capacité à oxyder les graisses exogènes après un repas que leurs homologues sédentaires (Stubbs et al. 1995).

Dans cette thèse, nous avons eu l'opportunité d'avoir accès à des protocoles où la balance énergétique des sujets a été maintenue stable, permettant d'étudier l'effet de différents niveaux d'activité sur les niveaux circulants des lipides chez des sujets en bonne santé, indépendamment des effets que peut avoir l'activité ou l'inactivité physique sur les stocks de tissu adipeux. Dans ces circonstances, les résultats de l'étude LIPOX qui ont fait l'objet d'une précédente publication (Bergouignan et al. 2013) ont permis de montrer une modification de la cinétique des triglycérides en réponse à un repas lors des interventions sur le niveau d'activité physique, suggérant un impact de celui-ci sur le devenir des acides gras alimentaires.

En accord avec la littérature, dans le protocole LIPOX, les sujets inactifs présentaient des taux plasmatiques de triglycérides à jeun plus élevés que leurs homologues actifs. Après ingestion d'un repas test, les sujets inactifs présentaient également des taux circulants de triglycérides plus élevés et une moindre oxydation lipidique du palmitate et de l'oléate (Bergouignan et al. 2013). En parallèle, l'expression génique de la lipoprotéine lipase LPL, du récepteur CD36 (Collagen type I receptor, thrombospondin receptor), du transporteur FATP1 (Fatty acid transport protein 1) et de mtGAPT (Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase) était

diminuée dans le muscle *vastus lateralis* des sujets inactifs en comparaison des sujets actifs, indiquant une diminution de la captation des lipides par le muscle et une diminution de la capacité à oxyder les lipides avec l'inactivité (Bergouignan et al. 2013). Les deux types d'intervention, entraînement et désentraînement, ont induit des effets opposés sur l'utilisation des lipides totaux, mais seule la diminution de l'oxydation totale des lipides par le désentraînement était significative, principalement expliquée par un changement dans l'oxydation des lipides exogènes. Enfin, le désentraînement a également augmenté l'apparition des acides gras dans les chylomicrons et les acides gras non estérifiés NEFA suggérant une diminution de la clairance et de la captation des acides gras par les tissus périphériques lors de l'inactivité (Bergouignan et al. 2013).

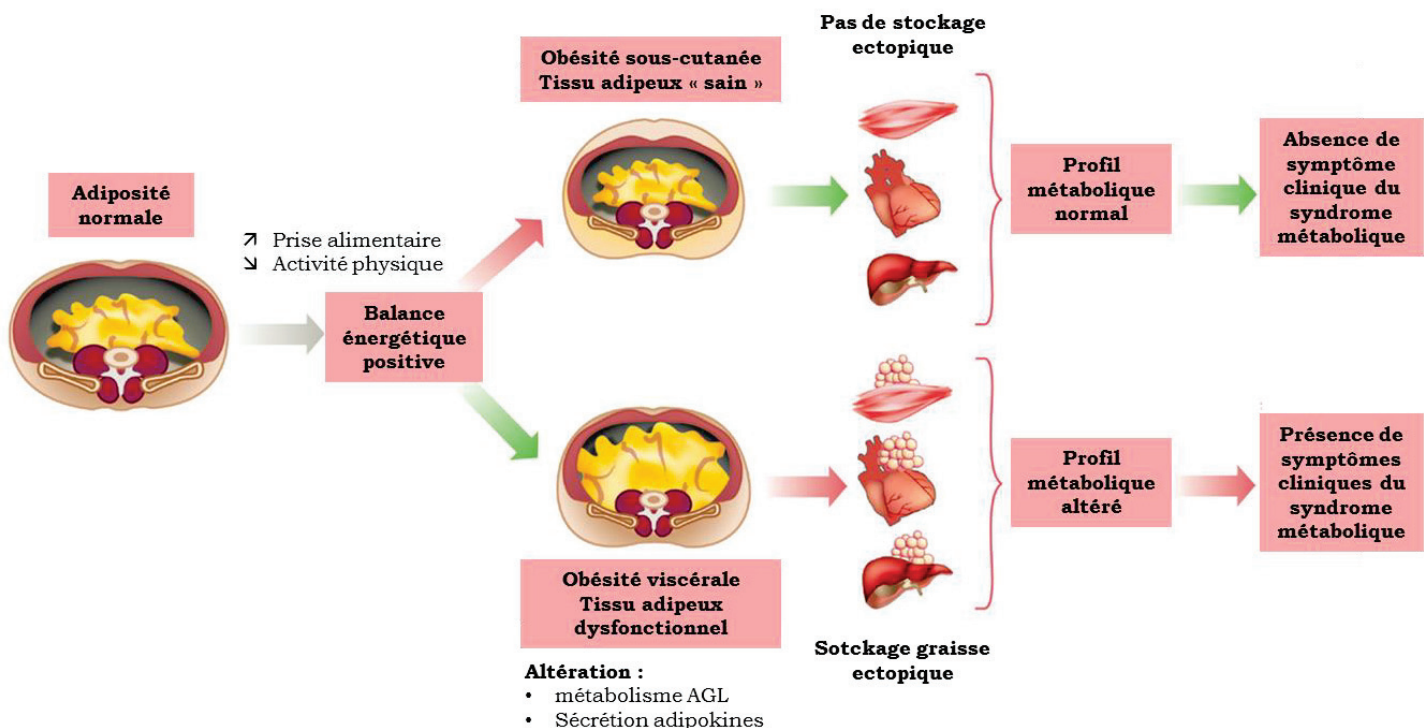
Dans la continuité de ces résultats, l'inactivité physique sévère induite dans le protocole de bed-rest a également augmenté les triglycérides dans la circulation, de façon concomitante avec une diminution de l'expression musculaire des gènes de transporteurs d'acides gras dans le muscle et les mitochondries, *i.e.* respectivement FAT/CD36 et CPT1, supportant l'hypothèse d'une diminution de la captation des acides gras par le muscle. Cette altération était associée avec une diminution de la capacité oxydative du muscle et de l'oxydation lipidique totale. L'association que nous avons montré, dans le protocole de bed-rest, entre les changements dans les taux plasmatiques de triglycérides et ANGPTL3, un acteur hépatique du métabolisme lipidique, indique qu'une inhibition de la LPL dans le foie par l'inactivité physique pourrait également impacter directement le métabolisme hépatique des lipides. L'activité de la LPL dans le muscle et le foie n'a cependant pas été mesurée dans ce protocole, ce qui limite nos conclusions sur les causes exactes de l'hypertriglycéridémie de nos sujets.

### C. Inactivité physique et stockage ectopique

Les complications de l'obésité sont associées à la répartition anatomique de l'excès de graisse plus qu'au simple indice de masse corporelle. En effet, les lipides peuvent s'accumuler dans des tissus non classiquement associés au stockage des lipides, phénomène appelé stockage de graisse ectopique qui peut participer aux complications de l'obésité via des phénomènes de lipotoxicité ou de dysfonctionnement des organes (Miranda et al. 2005; Despres and Lemieux 2006).

D'un point de vue mécanistique, lorsque la balance énergétique est positive, expliquée soit par une prise alimentaire excessive soit par l'inactivité physique, ou

les deux combinés, si le stockage de graisse a lieu dans le tissu adipeux sous-cutané qui est insulino-sensible, les fonctions métaboliques sont peu altérées et il y a un moindre risque de développement du syndrome métabolique (Figure 31). En revanche, l'absence ou l'altération du tissu adipeux sous-cutané, ainsi que des conditions d'insulino-résistance associée à une incapacité à stocker l'excès d'énergie, favorise le dépôt ectopique du surplus d'acides gras, présents dans la circulation, dans différents tissus tels que le cœur, le foie, le pancréas, le muscle squelettique ou le tissu adipeux viscéral (Despres and Lemieux 2006). Les mécanismes des conséquences délétères de ces dépôts ectopiques impliquent l'hypertrophie, l'inflammation et la fibrose des tissus (Britton and Fox 2011).



**Figure 31. Principe du stockage ectopique des graisses.** Lors d'une balance énergétique positive l'excédent énergétique est stocké sous forme lipidique soit dans le tissu adipeux sous-cutané sain, soit dans le tissu adipeux viscéral et de façon ectopique dans d'autres tissus périphériques quand le tissu adipeux est altéré.

*D'après Despres and Lemieux (2006)*

Les raisons pour lesquelles l'excès de lipides est déposé dans des tissus ectopiques plutôt que dans le tissu adipeux sont incomplètement comprises. L'une des hypothèses est l'inextensibilité du tissu adipeux. Nous faisons l'hypothèse que l'activité physique en modulant la capacité à oxyder les acides gras, notamment au niveau du muscle, est un deuxième mécanisme clef. Dans le foie, quand l'apport de



lipides dépasse la capacité adaptative du métabolisme, ils sont redirigés vers des voies métaboliques non oxydatives, induisant une accumulation intracellulaire de dérivés lipidiques toxiques, et des lésions hépatocellulaires surviennent (NAFLD). Bien qu'il soit admis que l'inactivité physique joue un rôle dans le développement des maladies métaboliques, son impact sur le métabolisme hépatique et dans le développement de NAFLD ne sont pas encore bien définies. Dans cette thèse, nous avons eu l'opportunité unique d'étudier les effets d'une inactivité extrême induite dans un protocole de bed-rest, sur les marqueurs hépatiques de stades sévères de NAFLD dans des conditions où la balance énergétique des sujets a été maintenue stable. De plus, nous avons examiné l'effet protecteur de l'exercice physique, combinant exercice de type aérobie et en résistance, en contre-mesure du bed-rest, sur les changements de marqueurs hépatiques de NAFLD.

Dans cette étude, nous avons montré, dans des conditions de contrôle de la balance énergétique, que l'induction d'une inactivité physique sévère augmente les marqueurs hépatiques associés avec la stéatose hépatique, stéatohépatite et d'autres stades encore plus sévères de NAFLD. Ces résultats supportent les observations faites dans des études transversales montrant une plus grande prévalence de NAFLD chez des hommes normo-pondérés sédentaires que leurs homologues physiquement actifs (Rector and Thyfault 2011). Ceci est également cohérent avec les études réalisées dans des modèles murins montrant que la transition d'un état actif à sédentaire induit une augmentation du risque de stéatose hépatique de façon concomitante à une accumulation d'intermédiaires lipogènes, une diminution de l'oxydation des lipides dans le foie et d'une hypertriglycéridémie, des symptômes associés avec les NAFLD (Zderic and Hamilton 2006; Rector et al. 2008).

Après deux mois de bed-rest, les transaminases (AST et ALT) sont augmentées dans la circulation tout en restant dans des gammes de concentrations normales. De façon similaire, des taux élevés mais normaux ont été observés chez de nombreux patients avec des NAFLD et sont associés avec des risques plus élevés de développement de désordres métaboliques et de diabète (Burgert et al. 2006; Preiss and Sattar 2008). Bien que des taux élevés de transaminases soient couramment utilisées pour détecter la présence de NAFLD (Harrison et al. 2008), ils représentent un mauvais indicateur de NASH quand ils sont utilisés seuls. Nous les avons ainsi examinés en combinaison avec d'autres marqueurs plus spécifiques de stéatohépatite, les fragments de cytokératine 18 (CK18). Suite à la mort cellulaire apoptotique d'hépatocytes altérés, les fragments de CK18 clivés par la caspase, la

protéine majeure des filaments intermédiaire dans le foie, sont sécrétés dans la circulation. L'activité apoptotique du foie étant associée à la stéatohépatite, mais pas à la stéatose hépatique isolée, les niveaux de fragments de CK18 dans la circulation permettent de différencier les stades de NAFLD (Anty et al. 2010). Nous avons montré que l'inactivité physique induite augmente CK18 et que la moitié de nos sujets contrôles atteignent les valeurs limites proposées pour la détection de NASH (Feldstein et al. 2009). Ces résultats, en plus de l'augmentation de l'indice AAC (indice combiné de AST, ALT et CK18) chez les sujets contrôles, suggèrent le début d'un développement de NAFLD en conditions d'inactivité physique. L'augmentation plus modérée d'ANGPTL3, indique que, dans nos conditions expérimentales, des stades plus sévères de NAFLD ne sont pas atteints. Cette étude étant rétrospective, ces résultats n'ont pas pu être vérifiés par biopsies invasives du foie ou par imagerie non invasive du gras hépatique. L'exploration des cytokines pro-inflammatoires circulantes aurait également pu apporter des informations sur l'inflammation pouvant participer au développement d'une stéato-hépatite. Hojbjerg et al. (2011) ont notamment montré une augmentation des protéines pro-inflammatoires C-réactive, IL-6, IL-10, MCP-1 et le TNF $\alpha$  chez patients insulino-résistants après 10 jours de bed-rest. De plus, l'étude de Rudwill et al. (2013), a montré une augmentation de la visfatine dans un protocole de bed-rest dans des conditions similaires de balance énergétique stable à notre étude. La visfatine, qui est positivement associée à l'IL-6 et la protéine C-réactive, semble être sécrétée par les macrophages infiltrant le tissu adipeux viscéral. Dans ce protocole, les auteurs n'ont pas montré de changement de masse grasse totale mais une modification de la répartition de la masse grasse (7% augmentation TA viscéral et pas de changement TA total).

Il est important de souligner qu'un stockage ectopique de la graisse a été noté de façon similaire dans la moelle osseuse (Trudel et al. 2009) et le muscle squelettique (Bergouignan et al. 2009) lors d'expérimentations de bed-rest. En association avec nos résultats, ces données suggèrent que le stockage ectopique des graisses pourrait refléter une réponse générale au bed-rest.

En parallèle, nous avons montré que le programme d'entraînement combinant exercice aérobie et en résistance, en contre-mesure du bed-rest, prévient en partie l'augmentation des marqueurs hépatiques induits par l'inactivité physique. Des études précédentes ont montré que des exercices aérobies d'intensité modérée améliorent les concentrations d'ALT chez des patients atteints de NAFLD

(Hickman et al. 2004) et diminuent le stockage ectopique dans le foie (Johnson et al. 2009) et l'inflammation (Keating et al. 2012). Chacun des types d'exercice, aérobie ou en résistance, pratiqué indépendamment ont amélioré le contenu lipidique intrahépatique, la sensibilité à l'insuline même en l'absence de perte de poids chez des adolescents obèses (Hallsworth et al. 2011). De façon cohérente avec nos résultats, un entraînement physique de type aérobie a également permis de diminuer CK18 chez des patients obèses (Fealy et al. 2012) et ANGPTL3 chez des patients atteints de maladies des artères coronaires (Beck et al. 2012).

Dans cette étude nous avons montré une corrélation positive entre AST et triglycérides, comme il a déjà été précédemment observé chez des patients obèses, suggérant l'implication du stockage ectopique lipidique dans les altérations du métabolisme du foie en conditions d'inactivité physique. Il est finalement important de noter que ce ne sont pas seulement les indices combinés incluant les marqueurs hépatiques qui ont augmenté pendant le bed-rest mais également l'indice CHA qui prend en compte dans son calcul la sensibilité à l'insuline. De plus, les changements dans les deux indices de NAFLD, CHA et AAC, étaient positivement associés avec l'augmentation des triglycérides circulants. L'ensemble de ces résultats suggèrent une relation entre sensibilité à l'insuline, le stockage ectopique des lipides et le métabolisme hépatique en condition d'inactivité physique. L'étude de Bergouignan et al. (2013), souligne le fait que l'inactivité physique induite conduit au développement d'une résistance à l'insuline et une hypertriglycémie de façon concomitante avec une réduction de la captation et de l'oxydation des lipides par le muscle. La compréhension de la chronologie sous-jacente de ces différentes altérations métaboliques et leur relation de cause à effets pourrait permettre une meilleure compréhension de la mise en place de ces mécanismes sous-jacents dans le développement des maladies hépatiques notamment en réponse aux comportements sédentaires. En effet, il n'est pas clairement établi quel mécanisme, de l'insulino-résistance ou de l'hypertriglycémie, est impliqué en premier puis induit l'autre.

#### D. Activité et inactivité physique : effets indépendants

Dans l'étude sur le bed-rest, nous avons montré que l'entraînement combinant exercice aérobie et résistif empêchait le développement de la résistance à l'insuline induite par le bed-rest, mais pas le développement de

l'hypertriglycéridémie, la diminution de l'oxydation des acides gras exogènes et total, la diminution de la captation des acides gras par le muscle, la diminution de la capacité oxydative et l'accumulation de gras dans le muscle squelettique. Les effets de l'inactivité physique semblent ainsi plus importants que ceux de l'exercice et suggèrent que ces deux comportements ne sont pas miroirs l'un de l'autre. Des études de populations récentes ont suggéré que l'effet délétère des comportements sédentaires sur la santé métabolique est indépendant de la pratique d'exercice d'intensité modérée. La prévention partielle induite par l'activité, observée dans le bed-rest, des effets négatifs induits par l'inactivité extrême peut être expliquée par l'absence d'activité physique d'intensité faible, par exemple marcher, prendre l'escalier, mais aussi tout mouvement quotidien du corps et le simple tonus postural, chez nos sujets de bed-rest du groupe exercice.

De façon intéressante, dans l'étude LIPOX, les effets de l'inactivité physique sur les fonctions métaboliques, comme l'insulino-sensibilité ou l'oxydation des lipides, sont également plus forts que ceux induits par l'entraînement malgré une durée d'intervention double. De plus, seule la transition vers l'inactivité physique, mais pas vers l'activité physique, a modifié l'expression tissulaire de miR-148b, et seule la surexpression de miR-148b dans l'exploration *in vitro* a eu un effet sur la voie de l'insuline. L'ensemble des résultats obtenus dans l'étude LIPOX suggère que des voies distinctes sont impliquées dans la transition depuis ou vers le statut actif, et que les réponses musculaires à ces changements impliquent des acteurs différentes. Certains travaux récents suggèrent, entre autres, que les mécanismes biologiques sous-tendant les effets de l'activité physique et de la sédentarité (au sens temps passé assis) pourraient être distincts, impliquant des gènes distincts (Simonen et al. 2003). On peut supposer au vu de nos résultats que de façon similaire les voies impliquées dans l'inactivité physique ne sont pas l'image en miroir de l'activité physique et qu'elles peuvent être différentes.

#### E. Les microARNs circulants : des biomarqueurs du niveau d'activité physique ?

Plusieurs études ont montré que les microARNs étaient présents dans les fluides corporels et que leur concentration dans la circulation était associée à certaines pathologies (Kanaan et al. 2012; Prabu et al. 2015; Romaine et al. 2015). Dès lors, leur utilisation en tant que biomarqueur circulant des performances physiques a été proposée et certaines études ont ainsi montré que l'expression de

certain microARNs était associée avec la capacité cardiorespiratoire (Baggish et al. 2011; Bye et al. 2013) et que l'exercice induisait des variations dans les taux circulants de certains microARNs. Dans cette thèse, nous avons voulu ainsi initialement déterminer si un ou des microARNs, seul ou en combinaison, pouvaient être utilisés comme des biomarqueurs du niveau d'activité physique.

L'étude exhaustive des microARNs par des puces dédiées dans l'étude LIPOX a permis d'identifier plusieurs microARNs différentiellement exprimés avec le niveau d'activité initial des sujets et/ou avec la modulation du niveau d'activité physique. Comme pour les puces à ADN, il est nécessaire ensuite de valider ces mesures de taux circulants de microARNs par quantification individuelle et sur des populations plus larges. Les quantifications individuelles ont montré des différences avec l'exploration par puce. Ceci peut s'expliquer soit par la présence de faux positifs liée à la technique d'analyse par puce, soit par le sous-échantillonnage des sujets de l'étude utilisé pour cette analyse transcriptomique. Par ailleurs, les résultats de quantification individuelle pour les microARNs sélectionnés étaient également différents entre les protocoles, malgré l'utilisation d'un microARN endogène de contrôle. Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par des différences de préparation du plasma, mais aussi la présence ou l'absence d'hémolyse, l'expression de certains microARNs pouvant être sensible à ce phénomène (Kirschner et al. 2011), des différences liées aux caractéristiques propres des populations (certains sérums provenant de sujets néozélandais) ou aux limites techniques de la quantification des microARNs dans la circulation.

D'une part, il existe de nombreux kits et protocoles d'extraction d'ARN dont l'optimisation est encore nécessaire et fait l'objet de publications (Spornraft et al. 2014). D'autre part la concentration d'ARN acellulaire dans les échantillons plasmatique étant marginale, la quantification par la technologie TaqMan est peut-être limite pour détecter des différences entre deux échantillons, et de la même façon que pour l'extraction les avancées technologiques de quantification peuvent améliorer l'étude des microARNs dans le plasma (Zhang et al. 2015).

Lorsque nous avons examiné l'expression des microARNs identifiés par les puces dans le sérum d'autres sujets, nous n'avons pas pu ainsi classer objectivement les sujets selon leur niveau d'activité physique sur la base des seuls niveaux circulants de ces microARNs. Dès lors, dans les conditions d'extraction, de quantification et de normalisation utilisées au cours de cette thèse, ils n'ont pas pu servir de biomarqueurs absolus pour caractériser le niveau d'activité physique d'un individu, contrairement à certains microARNs qui permettent de détecter le statut

diabétique (Prabu et al. 2015) ou cancéreux (Kanaan et al. 2012). Il est possible que cela devienne possible grâce au développement de méthodes plus précises telles que l'analyse des échantillons par la technique droplet permettant d'utiliser moins d'échantillons et de détecter des quantités plus faibles de microARNs, ce qui est très intéressant dans le cadre de l'étude des microARNs circulants (Zhang et al. 2015). L'utilisation des puces TLDA a également une limite car elles ne contiennent qu'une petite partie des microARNs décrits et validés, certains microARNs comme biomarqueurs potentiels du niveau d'activité physique ont ainsi pu ne pas être identifiés ici. Le développement d'autres puces, comme les GeneChip miRNA 4.0 Array de chez Affimetrix qui contiennent un plus grand nombre de microARNs identifiés et dont la technologie est également plus précise, dû à l'absence d'étape de préamplification qui est une source d'erreur, peuvent pallier aux limites rencontrées dans cette thèse.

Bien que les niveaux circulants de ces microARNs n'aient pas pu servir de biomarqueurs absolus du niveau d'activité physique, les niveaux d'expression de certains microARNs étaient associés à des paramètres liés à l'activité physique. Nous avons ainsi trouvé une association positive entre les niveaux circulants de miR-148b et miR-21 et la capacité cardiorespiratoire, des résultats inverses à ceux de l'étude de Bye et al. (2013). Dans notre étude, nous avons préalablement montré que les taux circulants de ces deux microARNs sont associés avec la masse grasse des sujets, et nous avons donc ajusté nos analyses sur la masse grasse des sujets, ce qui peut peut-être expliquer les différences avec l'étude de Bye et al. (2013). Il faut noter que les niveaux circulants de ces microARNs sont également associés à la dépense énergétique liée à l'activité physique suggérant ainsi que ces microARNs sont bien impliqués dans les effets de l'activité physique.

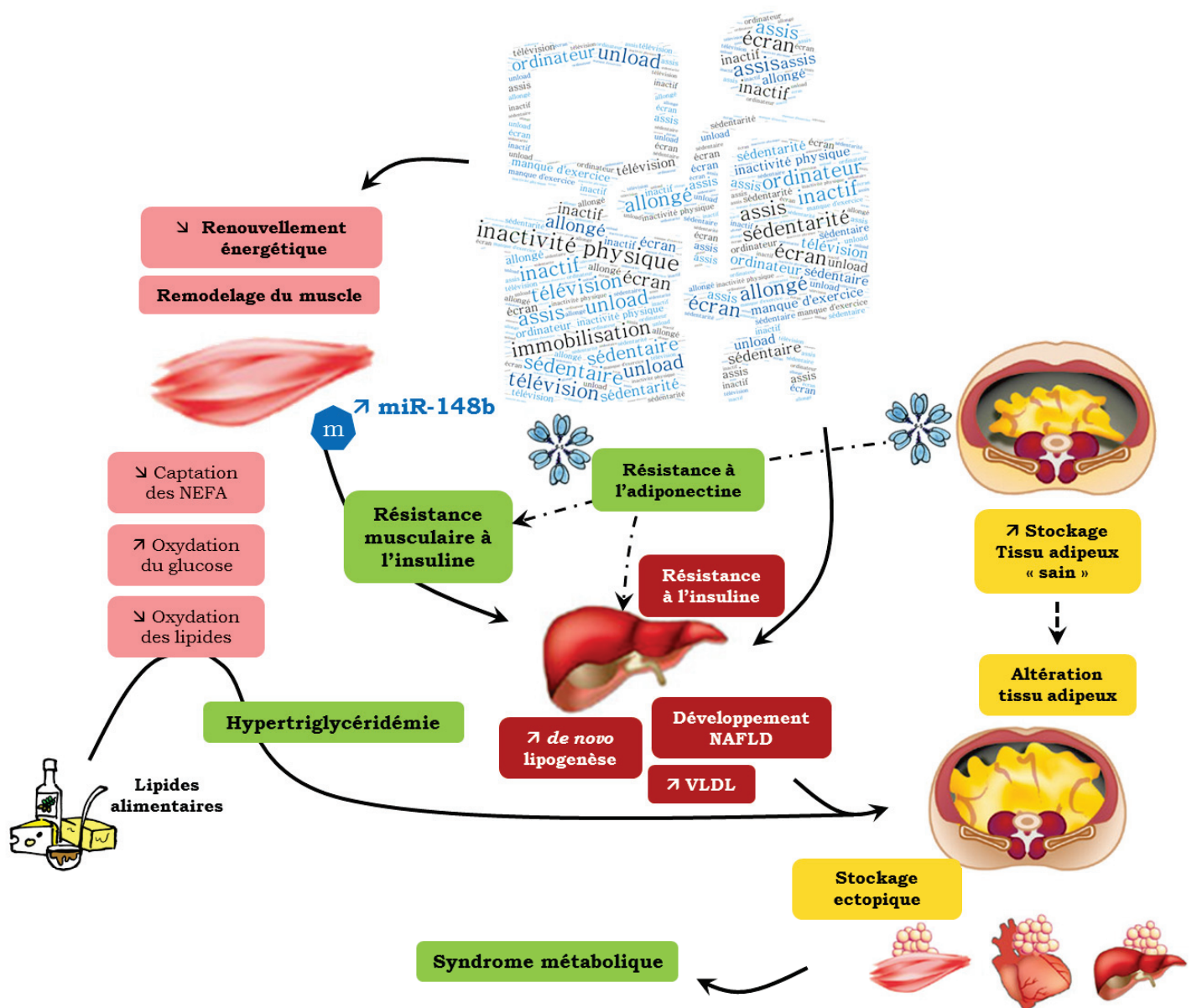
Malgré l'association positive entre le niveau d'expression de miR-148b et miR-21, et des paramètres de l'activité physique, les taux circulants de ces deux microARNs peuvent également refléter d'autres états physiologiques. En effet, miR-148b est surexprimé dans la circulation dans des états physiopathologiques notamment cancéreux tels que le cancer du foie (Wang et al. 2015a) et le cancer des poumons (Ghasemkhani et al. 2015), ou encore dans la néphropathie à IgA (Serino et al. 2015) ; et le niveau d'expression de miR-21 dans la circulation est plus élevé dans de nombreux cancers comme les gliomes (Ilhan-Mutlu et al. 2012), le cancer colorectal (Menendez et al. 2013) ou le cancer du sein (Liu et al. 2015b). Des

niveaux d'expression élevés de ces deux microARNs dans la circulation ne seraient donc peut-être pas uniquement le reflet d'un niveau élevé d'activité physique, associé à des capacités physiques plus élevées, mais pourraient témoigner d'un état physiopathologique particulier comme la présence ou le risque de cancer.

Ainsi, l'utilisation des microARNs circulants en tant que biomarqueurs du niveau d'activité physique représente un intérêt majeur en terme de santé publique mais les résultats obtenus dans cette thèse mis à la lueur de la littérature, notamment l'association des niveaux circulants de ces microARNs avec d'autres états physiologiques ou pathologiques, mettent en avant les limites de ce type d'approche pour appréhender le niveau d'activité physique, méritant de plus amples explorations.







**Figure 32. Implication de l'adiponectine et de miR-148b dans les mécanismes sous-jacents des altérations métaboliques induites par l'inactivité physique.** Les résultats de ce travail ont permis de mettre en évidence que l'inactivité physique induisait une augmentation de l'expression de miR-148b dans le muscle, une augmentation de l'adiponectine plasmatique et le développement d'une résistance musculaire à l'adiponectine participant au développement d'une résistance à l'insuline. En parallèle, l'inactivité physique augmente les triglycérides plasmatiques et induit un stockage ectopique des lipides au niveau du foie. NAFLD, stéatose hépatique non alcoolique ; NEFA, acides gras non estérifiés ; VLDL, lipoprotéines de très basse densité.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le niveau habituel d'activité physique est un facteur essentiel à la fois dans le développement et la prévention des pathologies chroniques. Actuellement, les recommandations d'activité physique de l'OMS sont principalement centrées sur les activités physiques d'intensité modérée à très intense principalement liées à l'exercice, mais ne prennent pas ou peu en compte l'activité physique quotidienne non liée à l'exercice. Afin de mieux comprendre les relations entre l'état de santé des individus et l'activité et inactivité physique, il est nécessaire de comprendre les mécanismes impliqués dans ces différents niveaux d'activité et leurs effets respectifs sur la santé.

Nous avons montré que les effets de l'activité et inactivité physique impliquent d'autres tissus que le muscle, notamment le foie et le tissu adipeux, respectivement bénéfiques et délétères, à l'échelle du corps entier, et que l'importance de ces effets diffère selon l'intensité de l'activité physique. L'inactivité physique altère ainsi le métabolisme énergétique au niveau de ces trois organes, induisant notamment une diminution de la sensibilité à l'insuline, une hypertriglycéridémie, une diminution de l'oxydation des lipides, et des altérations pouvant induire un stockage ectopique des graisses (Figure 32). De plus, nous avons montré l'implication de l'adiponectine et des microARNs dans les mécanismes sous-jacents des effets de l'activité et inactivité physique sur le muscle.

Les résultats obtenus dans le bed-rest concernent exclusivement des femmes adultes normo-pondérées en bonne santé. Des études complémentaires étendues notamment à d'autres populations sont nécessaires et la mise au point d'une prévention efficace contre le développement de NAFLD reste à développer, combinant notamment des approches nutritionnelles et physiques. D'autre part, connaître le contenu lipidique du foie dans des protocoles similaires serait très utile, soit à l'aide de biopsies du foie ou par de nouvelles approches non invasives comme des séquences IRM permettant de mesurer les acides gras intracellulaires.

La compréhension des effets de l'activité physique sur l'adiponectine, suggérant notamment une action sensibilisatrice à l'adiponectine nécessite d'étudier le devenir de l'adiponectine, notamment sa clairance. Il se pourrait également que l'action de l'activité physique sur l'adiponectine ne soit pas

exclusivement musculaire, mais également hépatique, le foie étant son autre tissu cible principal. L'analyse conjointe de l'adiponectine dans le foie, le muscle ou le tissu adipeux pourrait permettre de compléter les connaissances quant au devenir de l'adiponectine. De plus, il serait intéressant d'étudier l'induction du signal de l'adiponectine dans les tissus cibles au niveau protéique, ce qui n'a pu être fait dans cette étude. L'activité physique et l'adiponectine induisant l'activation de l'AMPK, il serait intéressant de confirmer l'augmentation de la sensibilité à l'adiponectine par l'activité physique et montrer l'implication de l'adiponectine notamment au niveau de cette voie.

L'implication de miR-148b dans la transition du statut actif vers le statut inactif a été montrée dans un désentraînement de 4 semaines. Il serait intéressant d'étudier la cinétique de l'expression de miR-148b dans le muscle pour connaître son implication dans les différentes phases de l'inactivité, en aigu et sur le long terme afin de comprendre son implication dans l'adaptation du muscle à l'inactivité prolongée et dans comportements inactifs plus développés, *i.e.* la sédentarité. Il serait également d'intérêt majeur d'explorer la régulation transcriptionnelle de miR-148b, pour étudier les facteurs qui régulent son expression et d'identifier intégralement ses cibles et actions biologiques dans le muscle.

Enfin, il serait intéressant d'explorer le développement des altérations métaboliques au niveau cellulaire et à l'échelle du corps entier en réponse à différents niveaux d'inactivité physique, où les comportements sédentaires (temps passé assis) et inactifs seraient caractérisés et définis, permettant ainsi de mieux comprendre le rôle indépendant de ces comportements ; et ce dans des protocoles de type *time-course* où l'on suit le développement de ces altérations dans le temps pour comprendre la relation entre hyperinsulinémie et hyperlipidémie en réponse à l'inactivité physique, ces deux mécanismes se développant simultanément ou l'un induisant l'autre.





## REFERENCES



- Adams, G.R., Caiozzo, V.J. and Baldwin, K.M. (2003). Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models. *J Appl Physiol* 95(6): 2185-2201.
- Adlakha, Y.K. and Saini, N. (2014). Brain microRNAs and insights into biological functions and therapeutic potential of brain enriched miRNA-128. *Mol Cancer* 1333.
- Agarwal, V., Bell, G.W., Nam, J.W. and Bartel, D.P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* 4.
- Ainsworth, B.E., Haskell, W.L., Leon, A.S., Jacobs, D.R., Jr., Montoye, H.J., Sallis, J.F. and Paffenbarger, R.S., Jr. (1993). Compendium of physical activities: classification of energy costs of human physical activities. *Med Sci Sports Exerc* 25(1): 71-80.
- Allen, D.L., Bandstra, E.R., Harrison, B.C., Thorng, S., Stodieck, L.S., Kostenuik, P.J., Morony, S., Lacey, D.L., Hammond, T.G., Leinwand, L.L., Argraves, W.S., Bateman, T.A. and Barth, J.L. (2009). Effects of spaceflight on murine skeletal muscle gene expression. *J Appl Physiol* (1985) 106(2): 582-95.
- Alonso, R., Salavert, F., Garcia-Garcia, F., Carbonell-Caballero, J., Bleda, M., Garcia-Alonso, L., Sanchis-Juan, A., Perez-Gil, D., Marin-Garcia, P., Sanchez, R., Cubuk, C., Hidalgo, M.R., Amadoz, A., Hernansaiz-Ballesteros, R.D., Aleman, A., Tarraga, J., Montaner, D., Medina, I. and Dopazo, J. (2015). Babelomics 5.0: functional interpretation for new generations of genomic data. *Nucleic Acids Res* 43(W1): 117-121.
- Ameres, S.L. and Zamore, P.D. (2013). Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(8): 475-88.
- Andersen, K.K., Frystyk, J., Wolthers, O.D., Heuck, C. and Flyvbjerg, A. (2007). Gender differences of oligomers and total adiponectin during puberty: a cross-sectional study of 859 Danish school children. *J Clin Endocrinol Metab* 92(5): 1857-62.
- Anty, R., Iannelli, A., Patouraux, S., Bonnafous, S., Lavallard, V.J., Senni-Buratti, M., Amor, I.B., Staccini-Myx, A., Saint-Paul, M.C., Berthier, F., Huet, P.M., Le Marchand-Brustel, Y., Gugenheim, J., Gual, P. and Tran, A. (2010). A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Aliment Pharmacol Ther* 32(11-12): 1315-1322.
- Aoi, W., Ichikawa, H., Mune, K., Tanimura, Y., Mizushima, K., Naito, Y. and Yoshikawa, T. (2013). Muscle-enriched microRNA miR-486 decreases in circulation in response to exercise in young men. *Front Physiol* 480.
- Aoi, W., Naito, Y., Mizushima, K., Takanami, Y., Kawai, Y., Ichikawa, H. and Yoshikawa, T. (2010). The microRNA miR-696 regulates PGC-1 $\alpha$  in mouse skeletal muscle in response to physical activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298(4): 799-806.
- Arai, Y., Nakazawa, S., Kojima, T., Takayama, M., Ebihara, Y., Shimizu, K.-i., Yamamura, K., Homma, S., Osono, Y., Gondo, Y., Masui, Y., Inagaki, H., Kitagawa, K. and Hirose, N. (2006). High adiponectin concentration and its role for longevity in female centenarians. *Geriatr Gerontol Int* 6(1): 32-39.
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., Kuriyama, H., Nishida, M., Yamashita, S., Okubo, K., Matsubara, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T. and Matsuzawa, Y. (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257(1): 79-83.
- Arner, E., Mejhert, N., Kulyte, A., Balwierz, P.J., Pachkov, M., Cormont, M., Lorente-Cebrian, S., Ehrlund, A., Laurencikiene, J., Heden, P., Dahlman-Wright,



- K., Tanti, J.F., Hayashizaki, Y., Ryden, M., Dahlman, I., van Nimwegen, E., Daub, C.O. and Arner, P. (2012). Adipose tissue microRNAs as regulators of CCL2 production in human obesity. *Diabetes* 61(8): 1986-93.
- Arzumanyan, A., Friedman, T., Kotei, E., Ng, I.O., Lian, Z. and Feitelson, M.A. (2012). Epigenetic repression of E-cadherin expression by hepatitis B virus x antigen in liver cancer. *Oncogene* 31(5): 563-72.
- Attali, M. and Saint-Martin, J. (2010). *Dictionnaire culturel du sport*. Paris: Armand Colin.
- Auerbach, P., Nordby, P., Bendtsen, L.Q., Mehlsen, J.L., Basnet, S.K., Vestergaard, H., Ploug, T. and Stallknecht, B. (2013). Differential effects of endurance training and weight loss on plasma adiponectin multimers and adipose tissue macrophages in younger, moderately overweight men. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 305(5): 490-498.
- Avruch, J. (2007). MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim Biophys Acta* 1773(8): 1150-60.
- Baggish, A.L., Hale, A., Weiner, R.B., Lewis, G.D., Systrom, D., Wang, F., Wang, T.J. and Chan, S.Y. (2011). Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *J Physiol* 589(16): 3983-3994.
- Balsan, G.A., Vieira, J.L., Oliveira, A.M. and Portal, V.L. (2015). Relationship between adiponectin, obesity and insulin resistance. *Rev Assoc Med Bras* 61(1): 72-80.
- Bastard, J.P., Vatier, C. and Fève, B. (2012). L'adiponectine : une adipokine aux multiples visages. *Obésité* 7(4): 250-258.
- Bauche, I.B., Ait El Mkaem, S., Rezsöházy, R., Funahashi, T., Maeda, N., Miranda, L.M. and Brichard, S.M. (2006). Adiponectin downregulates its own production and the expression of its AdipoR2 receptor in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 345(4): 1414-24.
- Baumjohann, D. and Ansel, K.M. (2013). MicroRNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity. *Nat Rev Immunol* 13(9): 666-678.
- Beck, E.B., Erbs, S., Mobius-Winkler, S., Adams, V., Woitek, F.J., Walther, T., Hambrecht, R., Mohr, F.W., Stumvoll, M., Bluher, M., Schuler, G. and Linke, A. (2012). Exercise training restores the endothelial response to vascular growth factors in patients with stable coronary artery disease. *Eur J Prev Cardiol* 19(3): 412-418.
- Belles-Isles, M., Roy, R., Dansereau, G., Goulet, M., Roy, B., Bouchard, J.P. and Tremblay, J.P. (1993). Rapid selection of donor myoblast clones for muscular dystrophy therapy using cell surface expression of NCAM. *Eur J Histochem* 37(4): 375-380.
- Berg, A.H., Combs, T.P., Du, X., Brownlee, M. and Scherer, P.E. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7(8): 947-53.
- Bergouignan, A., Momken, I., Lefai, E., Antoun, E., Schoeller, D.A., Platat, C., Chery, I., Zahariev, A., Vidal, H., Gabert, L., Normand, S., Freyssenet, D., Laville, M., Simon, C. and Blanc, S. (2013). Activity energy expenditure is a major determinant of dietary fat oxidation and trafficking, but the deleterious effect of detraining is more marked than the beneficial effect of training at current recommendations. *Am J Clin Nutr* 98(3): 648-58.
- Bergouignan, A., Rudwill, F., Simon, C. and Blanc, S. (2011). Physical inactivity as the culprit of metabolic inflexibility: evidence from bed-rest studies. *J Appl Physiol* 111(4): 1201-1210.
- Bergouignan, A., Trudel, G., Simon, C., Chopard, A., Schoeller, D.A., Momken, I., Votruba, S.B., Desage, M., Burdge, G.C., Gauquelin-Koch, G., Normand, S. and

- Blanc, S. (2009). Physical inactivity differentially alters dietary oleate and palmitate trafficking. *Diabetes* 58(2): 367-76.
- Berner, H.S., Lyngstadaas, S.P., Spahr, A., Monjo, M., Thommesen, L., Drevon, C.A., Syversen, U. and Reseland, J.E. (2004). Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. *Bone* 35(4): 842-9.
- Bernstein, M.S., Morabia, A. and Sloutskis, D. (1999). Definition and prevalence of sedentarism in an urban population. *Am J Public Health* 89(6): 862-7.
- Berryman, J.W. (1989). The tradition of the "six things non-natural": exercise and medicine from Hippocrates through ante-bellum America. *Exerc Sport Sci Rev* 17:515-59.
- Berryman, J.W. (2010). Exercise is medicine: a historical perspective. *Curr Sports Med Rep* 9(4): 195-201.
- Bertrais, S., Beyeme-Ondoua, J.P., Czernichow, S., Galan, P., Hercberg, S. and Oppert, J.M. (2005). Sedentary behaviors, physical activity, and metabolic syndrome in middle-aged French subjects. *Obes Res* 13(5): 936-944.
- Bischoff, A., Bayerlova, M., Strotbek, M., Schmid, S., Beissbarth, T. and Olayioye, M.A. (2015). A global microRNA screen identifies regulators of the ErbB receptor signaling network. *Cell Commun Signal* 13(5): doi: 10.1186/s12964-015-0084-z.
- Biswas, A., Oh, P.I., Faulkner, G.E., Bajaj, R.R., Silver, M.A., Mitchell, M.S. and Alter, D.A. (2015). Sedentary time and its association with risk for disease incidence, mortality, and hospitalization in adults: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 162(2): 123-132.
- Bjursell, M., Ahnmark, A., Bohlooly, Y.M., William-Olsson, L., Rhedin, M., Peng, X.R., Ploj, K., Gerdin, A.K., Arnerup, G., Elmgreen, A., Berg, A.L., Oscarsson, J. and Linden, D. (2007). Opposing effects of adiponectin receptors 1 and 2 on energy metabolism. *Diabetes* 56(3): 583-93.
- Bluher, M., Bullen, J.W., Jr., Lee, J.H., Kralisch, S., Fasshauer, M., Klöting, N., Niebauer, J., Schon, M.R., Williams, C.J. and Mantzoros, C.S. (2006). Circulating adiponectin and expression of adiponectin receptors in human skeletal muscle: associations with metabolic parameters and insulin resistance and regulation by physical training. *J Clin Endocrinol Metab* 91(6): 2310-6.
- Bluher, M., Williams, C.J., Klöting, N., Hsi, A., Ruschke, K., Oberbach, A., Fasshauer, M., Berndt, J., Schon, M.R., Wolk, A., Stumvoll, M. and Mantzoros, C.S. (2007). Gene expression of adiponectin receptors in human visceral and subcutaneous adipose tissue is related to insulin resistance and metabolic parameters and is altered in response to physical training. *Diabetes Care* 30(12): 3110-5.
- Booth, F.W., Chakravarthy, M.V., Gordon, S.E. and Spangenburg, E.E. (2002). Waging war on physical inactivity: using modern molecular ammunition against an ancient enemy. *J Appl Physiol* (1985) 93(1): 3-30.
- Bouassida, A., Chamari, K., Zaouali, M., Feki, Y., Zbidi, A. and Tabka, Z. (2010). Review on leptin and adiponectin responses and adaptations to acute and chronic exercise. *Br J Sports Med* 44(9): 620-630.
- Bouchard, C. (2001). Physical activity and health: introduction to the dose-response symposium. *Med Sci Sports Exerc* 33(6 Suppl): 347-50.
- Britton, K.A. and Fox, C.S. (2011). Ectopic fat depots and cardiovascular disease. *Circulation* 124(24): 837-841.
- Brochu-Gaudreau, K., Rehfeldt, C., Blouin, R., Bordignon, V., Murphy, B.D. and Palin, M.F. (2010). Adiponectin action from head to toe. *Endocrine* 37(1): 11-32.
- Bruun, J.M., Helge, J.W., Richelsen, B. and Stallknecht, B. (2006). Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose

- tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290(5): 961-957.
- Burgert, T.S., Taksali, S.E., Dziura, J., Goodman, T.R., Yeckel, C.W., Papademetris, X., Constable, R.T., Weiss, R., Tamborlane, W.V., Savoye, M., Seyal, A.A. and Caprio, S. (2006). Alanine aminotransferase levels and fatty liver in childhood obesity: associations with insulin resistance, adiponectin, and visceral fat. *J Clin Endocrinol Metab* 91(11): 4287-4294.
- Bye, A., Rosjo, H., Aspenes, S.T., Condorelli, G., Omland, T. and Wisloff, U. (2013). Circulating microRNAs and aerobic fitness--the HUNT-Study. *PLoS One* 8(2): e57496.
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F. and Croce, C.M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24): 15524-9.
- Caminos, J.E., Nogueiras, R., Gallego, R., Bravo, S., Tovar, S., Garcia-Caballero, T., Casanueva, F.F. and Dieguez, C. (2005). Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 90(7): 4276-86.
- Carter, M.I. and Hinton, P.S. (2014). Physical activity and bone health. *Mo Med* 111(1): 59-64.
- Caspersen, C.J., Powell, K.E. and Christenson, G.M. (1985). Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Reports* 100(2): 126-131.
- Caudwell, P., Gibbons, C., Finlayson, G., Naslund, E. and Blundell, J. (2014). Exercise and weight loss: no sex differences in body weight response to exercise. *Exerc Sport Sci Rev* 42(3): 92-101.
- Chandrasekar, B., Patel, D.N., Mummidi, S., Kim, J.-w., Clark, R.A. and Valente, A.J. (2008). Interleukin-18 Suppresses Adiponectin Expression in 3T3-L1 Adipocytes via a Novel Signal Transduction Pathway Involving ERK1/2-dependent NFATc4 Phosphorylation. *J Biol Chem* 283(7): 4200-4209.
- Chang, S.P., Chen, Y.H., Chang, W.C., Liu, I.M. and Cheng, J.T. (2006). Increase of adiponectin receptor gene expression by physical exercise in soleus muscle of obese Zucker rats. *Eur J Appl Physiol* 97(2): 189-95.
- Chaussade, C., Pirola, L., Bonnafous, S., Blondeau, F., Brenz-Verca, S., Tronchere, H., Portis, F., Rusconi, S., Payrastre, B., Laporte, J. and Van Obberghen, E. (2003). Expression of myotubularin by an adenoviral vector demonstrates its function as a phosphatidylinositol 3-phosphate [PtdIns(3)P] phosphatase in muscle cell lines: involvement of PtdIns(3)P in insulin-stimulated glucose transport. *Mol Endocrinol* 17(12): 2448-60.
- Chekulaeva, M., Filipowicz, W. and Parker, R. (2009). Multiple independent domains of dGW182 function in miRNA-mediated repression in *Drosophila*. *Rna* 15(5): 794-803.
- Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M. and Hannon, G.J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 465(7298): 584-9.
- Chen, B., Lam, K.S.L., Wang, Y., Wu, D., Lam, M.C., Shen, J., Wong, L., Hoo, R.L.C., Zhang, J. and Xu, A. (2006). Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 341(2): 549-556.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K. and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436(7051): 740-4.

- Chopard, A., Lecunff, M., Danger, R., Lamirault, G., Bihouee, A., Teusan, R., Jasmin, B.J., Marini, J.F. and Leger, J.J. (2009). Large-scale mRNA analysis of female skeletal muscles during 60 days of bed rest with and without exercise or dietary protein supplementation as countermeasures. *Physiol Genomics* 38(3): 291-302.
- Christiansen, T., Paulsen, S.K., Bruun, J.M., Ploug, T., Pedersen, S.B. and Richelsen, B. (2010). Diet-induced weight loss and exercise alone and in combination enhance the expression of adiponectin receptors in adipose tissue and skeletal muscle, but only diet-induced weight loss enhanced circulating adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 95(2): 911-9.
- Chun, K.H., Araki, K., Jee, Y., Lee, D.H., Oh, B.C., Huang, H., Park, K.S., Lee, S.W., Zabolotny, J.M. and Kim, Y.B. (2012). Regulation of glucose transport by ROCK1 differs from that of ROCK2 and is controlled by actin polymerization. *Endocrinology* 153(4): 1649-1662.
- Chun, K.H., Choi, K.D., Lee, D.H., Jung, Y., Henry, R.R., Ciaraldi, T.P. and Kim, Y.B. (2011). In vivo activation of ROCK1 by insulin is impaired in skeletal muscle of humans with type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300(3): 536-542.
- Cimino, D., De Pitta, C., Orso, F., Zampini, M., Casara, S., Penna, E., Quaglino, E., Forni, M., Damasco, C., Pinatel, E., Ponzzone, R., Romualdi, C., Brisken, C., De Bortoli, M., Biglia, N., Provero, P., Lanfranchi, G. and Taverna, D. (2013). miR148b is a major coordinator of breast cancer progression in a relapse-associated microRNA signature by targeting ITGA5, ROCK1, PIK3CA, NRAS, and CSF1. *Faseb J* 27(3): 1223-1235.
- Cnop, M., Havel, P.J., Utzschneider, K.M., Carr, D.B., Sinha, M.K., Boyko, E.J., Retzlaff, B.M., Knopp, R.H., Brunzell, J.D. and Kahn, S.E. (2003). Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia* 46(4): 459-69.
- Cotman, C.W. and Berchtold, N.C. (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* 25(6): 295-301.
- Cullen, B.R. (2004). Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell* 16(6): 861-5.
- Da Silva, N.D.J., Fernandes, T., Soci, U.P., Monteiro, A.W., Phillips, M.I. and EM, D.E.O. (2012). Swimming training in rats increases cardiac MicroRNA-126 expression and angiogenesis. *Med Sci Sports Exerc* 44(8): 1453-62.
- Davidson, P.K., Gallagher, I.J., Hartman, J.W., Tarnopolsky, M.A., Dela, F., Helge, J.W., Timmons, J.A. and Phillips, S.M. (2011). High responders to resistance exercise training demonstrate differential regulation of skeletal muscle microRNA expression. *J Appl Physiol* (1985) 110(2): 309-17.
- Davis, T.H., Cuellar, T.L., Koch, S.M., Barker, A.J., Harfe, B.D., McManus, M.T. and Ullian, E.M. (2008). Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus. *J Neurosci* 28(17): 4322-30.
- Deepa, S.S. and Dong, L.Q. (2009). APPL1: role in adiponectin signaling and beyond. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296(1): 22-36.
- Denzel, M.S., Scimia, M.-C., Zumstein, P.M., Walsh, K., Ruiz-Lozano, P. and Ranscht, B. (2010). T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice. *J Clin Invest* 120(12): 4342-4352.
- Despres, J.P. and Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444(7121): 881-7.
- Dietz, W.H. (1996). The role of lifestyle in health: the epidemiology and consequences of inactivity. *Proc Nutr Soc* 55(3): 829-40.
- Drummond, M.J., McCarthy, J.J., Fry, C.S., Esser, K.A. and Rasmussen, B.B. (2008). Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression

- at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(6): 1333-1340.
- Egan, B. and Zierath, J.R. (2013). Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab* 17(2): 162-184.
- Eisenberg, I., Eran, A., Nishino, I., Moggio, M., Lamperti, C., Amato, A.A., Lidov, H.G., Kang, P.B., North, K.N., Mitrani-Rosenbaum, S., Flanigan, K.M., Neely, L.A., Whitney, D., Beggs, A.H., Kohane, I.S. and Kunkel, L.M. (2007). Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(43): 17016-17021.
- Elley, C.R., Kerse, N.M. and Arroll, B. (2003). Why target sedentary adults in primary health care? Baseline results from the Waikato Heart, Health, and Activity Study. *Preventive Medicine* 37(4): 342-348.
- Ender, C., Krek, A., Friedlander, M.R., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., Pfeffer, S., Rajewsky, N. and Meister, G. (2008). A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol Cell* 32(4): 519-28.
- Farias, J.M., Maggi, R.M., Tromm, C.B., Silva, L.A., Luciano, T.F., Marques, S.O., Lira, F.S., de Souza, C.T. and Pinho, R.A. (2012). Exercise training performed simultaneously to a high-fat diet reduces the degree of insulin resistance and improves adipoR1-2/APPL1 protein levels in mice. *Lipids Health Dis* 11(134): doi: 10.1186/1476-511X-11-134.
- Fealy, C.E., Haus, J.M., Solomon, T.P., Pagadala, M., Flask, C.A., McCullough, A.J. and Kirwan, J.P. (2012). Short-term exercise reduces markers of hepatocyte apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Appl Physiol* 113(1): 1-6.
- Feldstein, A.E., Wieckowska, A., Lopez, A.R., Liu, Y.C., Zein, N.N. and McCullough, A.J. (2009). Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology* 50(4): 1072-1078.
- Ferguson, M.A., White, L.J., McCoy, S., Kim, H.W., Petty, T. and Wilsey, J. (2004). Plasma adiponectin response to acute exercise in healthy subjects. *Eur J Appl Physiol* 91(2-3): 324-9.
- Fernandes, T., Hashimoto, N.Y., Magalhaes, F.C., Fernandes, F.B., Casarini, D.E., Carmona, A.K., Krieger, J.E., Phillips, M.I. and Oliveira, E.M. (2011a). Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin ii, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension* 58(2): 182-9.
- Fernandes, T., Magalhaes, F.C., Roque, F.R., Phillips, M.I. and Oliveira, E.M. (2012). Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors: role of microRNAs-16, -21, and -126. *Hypertension* 59(2): 513-20.
- Fernandes, T., Soci, U.P. and Oliveira, E.M. (2011b). Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: microRNAs and molecular determinants. *Braz J Med Biol Res* 44(9): 836-47.
- Fiaschi, T., Magherini, F., Gamberi, T., Modesti, P. and Modesti, A. (2014). Adiponectin as a tissue regenerating hormone: more than a metabolic function. *Cell Mol Life Sci* 71(10): 1917-1925.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9(2): 102-14.
- Fish, J.E., Santoro, M.M., Morton, S.U., Yu, S., Yeh, R.F., Wythe, J.D., Ivey, K.N., Bruneau, B.G., Stainier, D.Y. and Srivastava, D. (2008). miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell* 15(2): 272-84.
- Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B. and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19(1): 92-105.

- Friedrichsen, M., Mortensen, B., Pehmoller, C., Birk, J.B. and Wojtaszewski, J.F. (2013). Exercise-induced AMPK activity in skeletal muscle: role in glucose uptake and insulin sensitivity. *Mol Cell Endocrinol* 366(2): 204-214.
- Fruebis, J., Tsao, T.S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M.R., Yen, F.T., Bihain, B.E. and Lodish, H.F. (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4): 2005-10.
- Gao, H., Kim, Y.M., Chen, P., Igase, M., Kawamoto, R., Kim, M.K., Kohara, K., Lee, J., Miki, T., Ong, R.T., Onuma, H., Osawa, H., Sim, X., Teo, Y.Y., Tabara, Y., Tai, E.S. and van Dam, R.M. (2013). Genetic variation in CDH13 is associated with lower plasma adiponectin levels but greater adiponectin sensitivity in East Asian populations. *Diabetes* 62(12): 4277-83.
- Garekani, E.T., Mohebbi, H., Kraemer, R.R. and Fathi, R. (2011). Exercise training intensity/volume affects plasma and tissue adiponectin concentrations in the male rat. *Peptides* 32(5): 1008-12.
- Gavrila, A., Peng, C.K., Chan, J.L., Mietus, J.E., Goldberger, A.L. and Mantzoros, C.S. (2003). Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: comparison with leptin, circulating soluble leptin receptor, and cortisol patterns. *J Clin Endocrinol Metab* 88(6): 2838-43.
- Ghasemkhani, N., Shadvar, S., Masoudi, Y., Talaei, A.J., Yahaghi, E., Goudarzi, P.K. and Shakiba, E. (2015). Down-regulated MicroRNA 148b expression as predictive biomarker and its prognostic significance associated with clinicopathological features in non-small-cell lung cancer patients. *Diagn Pathol* 10(164): 015-0393.
- Golbidi, S. and Laher, I. (2014). Exercise induced adipokine changes and the metabolic syndrome. *J Diabetes Res* 2014(726861): doi: 10.1155/2014/726861.
- Goncalves, A.K., Dantas Florencio, G.L., Maisonnette de Atayde Silva, M.J., Cobucci, R.N., Giraldo, P.C. and Cote, N.M. (2014). Effects of physical activity on breast cancer prevention: a systematic review. *J Phys Act Health* 11(2): 445-54.
- Goodyear, L.J. (2000). AMP-activated protein kinase: a critical signaling intermediary for exercise-stimulated glucose transport? *Exerc Sport Sci Rev* 28(3): 113-6.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36(1): 59-74.
- Gu, W., Li, X., Liu, C., Yang, J., Ye, L., Tang, J., Gu, Y., Yang, Y., Hong, J., Zhang, Y., Chen, M. and Ning, G. (2006). Globular adiponectin augments insulin secretion from pancreatic islet beta cells at high glucose concentrations. *Endocrine* 30(2): 217-21.
- Halberg, N., Schraw, T.D., Wang, Z.V., Kim, J.Y., Yi, J., Hamilton, M.P., Luby-Phelps, K. and Scherer, P.E. (2009). Systemic fate of the adipocyte-derived factor adiponectin. *Diabetes* 58(9): 1961-70.
- Hallsworth, K., Fattakhova, G., Hollingsworth, K.G., Thoma, C., Moore, S., Taylor, R., Day, C.P. and Trenell, M.I. (2011). Resistance exercise reduces liver fat and its mediators in non-alcoholic fatty liver disease independent of weight loss. *Gut* 60(9): 1278-1283.
- Hamilton, M.T., Hamilton, D.G. and Zderic, T.W. (2007). Role of low energy expenditure and sitting in obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Diabetes* 56(11): 2655-67.
- Han, J., Pedersen, J.S., Kwon, S.C., Belair, C.D., Kim, Y.K., Yeom, K.H., Yang, W.Y., Haussler, D., Blleloch, R. and Kim, V.N. (2009). Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell* 136(1): 75-84.

- Hara, K., Horikoshi, M., Yamauchi, T., Yago, H., Miyazaki, O., Ebinuma, H., Imai, Y., Nagai, R. and Kadowaki, T. (2006). Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. *Diabetes Care* 29(6): 1357-1362.
- Hara, T., Fujiwara, H., Nakao, H., Mimura, T., Yoshikawa, T. and Fujimoto, S. (2005). Body composition is related to increase in plasma adiponectin levels rather than training in young obese men. *Eur J Appl Physiol* 94(5-6): 520-6.
- Hardman, A.E. (2001). Issues of fractionization of exercise (short vs long bouts). *Med Sci Sports* 33(6): 421-427.
- Harrison, S.A., Oliver, D., Arnold, H.L., Gogia, S. and Neuschwander-Tetri, B.A. (2008). Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease. *Gut* 57(10): 1441-1447.
- Hayashino, Y., Jackson, J.L., Hirata, T., Fukumori, N., Nakamura, F., Fukuhara, S., Tsujii, S. and Ishii, H. (2014). Effects of exercise on C-reactive protein, inflammatory cytokine and adipokine in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Metabolism* 63(3): 431-440.
- He, Y., Lin, J., Kong, D., Huang, M., Xu, C., Kim, T.K., Etheridge, A., Luo, Y., Ding, Y. and Wang, K. (2015). Current State of Circulating MicroRNAs as Cancer Biomarkers. *Clin Chem* 61(9): 1138-55.
- HHS (1996). Physical activity and health: a report of the Surgeon General. Atlanta, Ga. : [Washington, D.C.] : Pittsburgh, PA: U.S. Dept. of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion.
- HHS (2006). Your Guide to Physical Activity and Your Heart: National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute.
- Hickman, I.J., Jonsson, J.R., Prins, J.B., Ash, S., Purdie, D.M., Clouston, A.D. and Powell, E.E. (2004). Modest weight loss and physical activity in overweight patients with chronic liver disease results in sustained improvements in alanine aminotransferase, fasting insulin, and quality of life. *Gut* 53(3): 413-419.
- Hoffstedt, J., Arvidsson, E., Sjolin, E., Wahlen, K. and Arner, P. (2004). Adipose tissue adiponectin production and adiponectin serum concentration in human obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 89(3): 1391-6.
- Hojbjerre, L., Sonne, M.P., Alibegovic, A.C., Nielsen, N.B., Dela, F., Vaag, A., Bruun, J.M. and Stallknecht, B. (2011). Impact of physical inactivity on adipose tissue low-grade inflammation in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 34(10): 2265-72. doi: 10.2337/dc11-0631. Epub 2011 Aug 11.
- Holland, W.L., Miller, R.A., Wang, Z.V., Sun, K., Barth, B.M., Bui, H.H., Davis, K.E., Bikman, B.T., Halberg, N., Rutkowski, J.M., Wade, M.R., Tenorio, V.M., Kuo, M.S., Brozinick, J.T., Zhang, B.B., Birnbaum, M.J., Summers, S.A. and Scherer, P.E. (2011). Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nat Med* 17(1): 55-63.
- Horenburg, S., Fischer-Posovszky, P., Debatin, K.M. and Wabitsch, M. (2008). Influence of sex hormones on adiponectin expression in human adipocytes. *Horm Metab Res* 40(11): 779-86.
- Hortobágyi, T., Dempsey, L., Fraser, D., Zheng, D., Hamilton, G., Lambert, J. and Dohm, L. (2000). Changes in muscle strength, muscle fibre size and myofibrillar gene expression after immobilization and retraining in humans. *J Physiol* 524(1): 293-304.
- Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y., Takahashi, M., Matsuda, M., Okamoto, Y., Iwahashi, H., Kuriyama, H., Ouchi, N., Maeda, K., Nishida, M., Kihara, S., Sakai, N., Nakajima, T., Hasegawa, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Nakamura, T., Yamashita, S., Hanafusa, T. and Matsuzawa, Y. (2000). Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(6): 1595-9.

- Hsu, S.-D., Tseng, Y.-T., Shrestha, S., Lin, Y.-L., Khaleel, A., Chou, C.-H., Chu, C.-F., Huang, H.-Y., Lin, C.-M., Ho, S.-Y., Jian, T.-Y., Lin, F.-M., Chang, T.-H., Weng, S.-L., Liao, K.-W., Liao, I.E., Liu, C.-C. and Huang, H.-D. (2014). miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res* 42(1): 78-85.
- Hu, E., Liang, P. and Spiegelman, B.M. (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271(18): 10697-703.
- Huang da, W., Sherman, B.T. and Lempicki, R.A. (2009). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 37(1): 1-13.
- Hug, C., Wang, J., Ahmad, N.S., Bogan, J.S., Tsao, T.-S. and Lodish, H.F. (2004). T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(28): 10308-10313.
- Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I. and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(47): 16961-6.
- Ibanez, J., Izquierdo, M., Martinez-Labari, C., Ortega, F., Grijalba, A., Forga, L., Idoate, F., Garcia-Unciti, M., Fernandez-Real, J.M. and Gorostiaga, E.M. (2010). Resistance training improves cardiovascular risk factors in obese women despite a significant decrease in serum adiponectin levels. *Obesity* 18(3): 535-541.
- Ilhan-Mutlu, A., Wagner, L., Wohrer, A., Furtner, J., Widhalm, G., Marosi, C. and Preusser, M. (2012). Plasma MicroRNA-21 concentration may be a useful biomarker in glioblastoma patients. *Cancer Invest.* 30(8): 615-21. Epub 2012 Aug 14.
- Inserm (2008). *Activité physique : contextes et effets sur la santé*. Paris, Frans: INSERM, Institut national de la santé et de la recherche médicale.
- Jäger, S., Handschin, C., St.-Pierre, J. and Spiegelman, B.M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(29): 12017-12022.
- Johnson, N.A., Sachinwalla, T., Walton, D.W., Smith, K., Armstrong, A., Thompson, M.W. and George, J. (2009). Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weight loss. *Hepatology* 50(4): 1105-1112.
- Jurimae, J., Hofmann, P., Jurimae, T., Maestu, J., Purge, P., Wonisch, M., Pokan, R. and von Duvillard, S.P. (2006a). Plasma adiponectin response to sculling exercise at individual anaerobic threshold in college level male rowers. *Int J Sports Med* 27(4): 272-7.
- Jurimae, J., Purge, P. and Jurimae, T. (2005). Adiponectin is altered after maximal exercise in highly trained male rowers. *Eur J Appl Physiol* 93(4): 502-5.
- Jurimae, J., Purge, P. and Jurimae, T. (2006b). Adiponectin and stress hormone responses to maximal sculling after volume-extended training season in elite rowers. *Metabolism* 55(1): 13-9.
- Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K. and Tobe, K. (2006). Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 116(7): 1784-92.
- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D. and Hardie, D.G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1(1): 15-25.
- Kanaan, Z., Rai, S.N., Eichenberger, M.R., Roberts, H., Keskey, B., Pan, J. and Galandiuk, S. (2012). Plasma miR-21: a potential diagnostic marker of colorectal cancer. *Ann Surg* 256(3): 544-51.



- Kawahara, Y., Megraw, M., Kreider, E., Iizasa, H., Valente, L., Hatzigeorgiou, A.G. and Nishikura, K. (2008). Frequency and fate of microRNA editing in human brain. *Nucleic Acids Res* 36(16): 5270-80.
- Keating, S.E., Hackett, D.A., George, J. and Johnson, N.A. (2012). Exercise and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 57(1): 157-166.
- Keller, P., Vollaard, N.B., Gustafsson, T., Gallagher, I.J., Sundberg, C.J., Rankinen, T., Britton, S.L., Bouchard, C., Koch, L.G. and Timmons, J.A. (2011). A transcriptional map of the impact of endurance exercise training on skeletal muscle phenotype. *J Appl Physiol* (1985) 110(1): 46-59.
- Kertesz, M., Iovino, N., Unnerstall, U., Gaul, U. and Segal, E. (2007). The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet* 39(10): 1278-84.
- Kharroubi, I., Rasschaert, J., Eizirik, D.L. and Cnop, M. (2003). Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun* 312(4): 1118-22.
- Khorshid, M., Hausser, J., Zavolan, M. and van Nimwegen, E. (2013). A biophysical miRNA-mRNA interaction model infers canonical and noncanonical targets. *Nat Methods* 10(3): 253-5.
- Kim, H.B., Kong, M., Kim, T.M., Suh, Y.H., Kim, W.H., Lim, J.H., Song, J.H. and Jung, M.H. (2006a). NFATc4 and ATF3 negatively regulate adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 55(5): 1342-52.
- Kim, M.J., Maachi, M., Debard, C., Loizon, E., Clement, K., Bruckert, E., Hainque, B., Capeau, J., Vidal, H. and Bastard, J.P. (2006b). Increased adiponectin receptor-1 expression in adipose tissue of impaired glucose-tolerant obese subjects during weight loss. *Eur J Endocrinol* 155(1): 161-5.
- Kim, V.N. (2004). MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol* 14(4): 156-9.
- Kintscher, U. (2007). Does adiponectin resistance exist in chronic heart failure? *Eur Heart J* 28(14): 1676-7.
- Kirschner, M.B., Kao, S.C., Edelman, J.J., Armstrong, N.J., Valley, M.P., van Zandwijk, N. and Reid, G. (2011). Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS One* 6(9): doi: 10.1371/journal.pone.0024145.
- Kobayashi, H., Ouchi, N., Kihara, S., Walsh, K., Kumada, M., Abe, Y., Funahashi, T. and Matsuzawa, Y. (2004). Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ Res* 94(4): 27-31.
- Kopf, S., Oikonomou, D., von Eynatten, M., Kieser, M., Zdunek, D., Hess, G., Morcos, M., Forsblom, C., Bierhaus, A., Groop, P.H., Nawroth, P.P. and Humpert, P.M. (2014). Urinary excretion of high molecular weight adiponectin is an independent predictor of decline of renal function in type 2 diabetes. *Acta Diabetol* 51(3): 479-89.
- Kozomara, A. and Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 42(1): 68-73.
- Kraemer, R.R., Aboudehen, K.S., Carruth, A.K., Durand, R.T., Acevedo, E.O., Hebert, E.P., Johnson, L.G. and Castracane, V.D. (2003). Adiponectin responses to continuous and progressively intense intermittent exercise. *Med Sci Sports Exerc* 35(8): 1320-5.
- Kraus, H. and Raab, W. (1961). Hypokinetic disease, diseases produced by lack of exercise. Springfield, Ill.: Thomas.
- Kriketos, A.D., Gan, S.K., Poynten, A.M., Furler, S.M., Chisholm, D.J. and Campbell, L.V. (2004). Exercise increases adiponectin levels and insulin sensitivity in humans. *Diabetes Care* 27(2): 629-30.
- Krol, J., Loedige, I. and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11(9): 597-610.

- Kubota, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Kubota, T., Moroi, M., Matsui, J., Eto, K., Yamashita, T., Kamon, J., Satoh, H., Yano, W., Froguel, P., Nagai, R., Kimura, S., Kadowaki, T. and Noda, T. (2002). Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 277(29): 25863-6.
- Kubota, N., Yano, W., Kubota, T., Yamauchi, T., Itoh, S., Kumagai, H., Kozono, H., Takamoto, I., Okamoto, S., Shiuchi, T., Suzuki, R., Satoh, H., Tsuchida, A., Moroi, M., Sugi, K., Noda, T., Ebinuma, H., Ueta, Y., Kondo, T., Araki, E., Ezaki, O., Nagai, R., Tobe, K., Terauchi, Y., Ueki, K., Minokoshi, Y. and Kadowaki, T. (2007). Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab* 6(1): 55-68.
- Kumada, M., Kihara, S., Sumitsuji, S., Kawamoto, T., Matsumoto, S., Ouchi, N., Arita, Y., Okamoto, Y., Shimomura, I., Hiraoka, H., Nakamura, T., Funahashi, T. and Matsuzawa, Y. (2003). Association of hypo adiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(1): 85-9.
- Lafontan, M. and Viguerie, N. (2006). Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin. *Curr Opin Pharmacol* 6(6): 580-5.
- Lakhdar, N., Denguezli, M., Zaouali, M., Zbidi, A., Tabka, Z. and Bouassida, A. (2014). Six months training alone or combined with diet alters HOMA-AD, HOMA-IR and plasma and adipose tissue adiponectin in obese women. *Neuro Endocrinol Lett* 35(5): 373-9.
- Laughlin, G.A., Barrett-Connor, E. and May, S. (2007). Sex-specific determinants of serum adiponectin in older adults: the role of endogenous sex hormones. *Int J Obes* 31(3): 457-465.
- Lavie, C.J., Arena, R., Swift, D.L., Johannsen, N.M., Sui, X., Lee, D.C., Earnest, C.P., Church, T.S., O'Keefe, J.H., Milani, R.V. and Blair, S.N. (2015). Exercise and the Cardiovascular System: Clinical Science and Cardiovascular Outcomes. *Circ Res* 117(2): 207-19.
- Lee, D.H., Shi, J., Jeoung, N.H., Kim, M.S., Zabolotny, J.M., Lee, S.W., White, M.F., Wei, L. and Kim, Y.B. (2009). Targeted disruption of ROCK1 causes insulin resistance in vivo. *J Biol Chem* 284(18): 11776-11780.
- Lee, I.M., Shiroma, E.J., Lobelo, F., Puska, P., Blair, S.N. and Katzmarzyk, P.T. (2012). Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *Lancet* 380(9838): 219-29.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75(5): 843-54.
- Lee, S., Park, Y., Dellsperger, K.C. and Zhang, C. (2011). Exercise training improves endothelial function via adiponectin-dependent and independent pathways in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301(2): 306-314.
- Lee, Y., Hur, I., Park, S.-Y., Kim, Y.-K., Suh, M.R. and Kim, V.N. (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J* 25(3): 522-532.
- Lee, Y.S. and Dutta, A. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 4199-227.
- Leick, L., Hellsten, Y., Fentz, J., Lyngby, S.S., Wojtaszewski, J.F., Hidalgo, J. and Pilegaard, H. (2009). PGC-1 $\alpha$  mediates exercise-induced skeletal muscle VEGF expression in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297(1): E92-103. doi: 10.1152/ajpendo.00076.2009. Epub 2009 Apr 28.
- Lin, S.L., Miller, J.D. and Ying, S.Y. (2006). Intronic microRNA (miRNA). *J Biomed Biotechnol* 4(26818).
- Liu, B.H., Wang, P.H., Wang, Y.C., Cheng, W.M., Mersmann, H.J. and Ding, S.T. (2008a). Fasting regulates the expression of adiponectin receptors in young growing pigs. *J Anim Sci* 86(12): 3377-84.

- Liu, G., Detloff, M.R., Miller, K.N., Santi, L. and Houle, J.D. (2012). Exercise modulates microRNAs that affect the PTEN/mTOR pathway in rats after spinal cord injury. *Exp Neurol* 233(1): 447-56.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L. and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305(5689): 1437-41.
- Liu, M., Chen, H., Wei, L., Hu, D., Dong, K., Jia, W., Dong, L.Q. and Liu, F. (2015a). Endoplasmic reticulum (ER) localization is critical for DsbA-L protein to suppress ER stress and adiponectin down-regulation in adipocytes. *J Biol Chem* 290(16): 10143-8.
- Liu, M. and Liu, F. (2010). Transcriptional and post-translational regulation of adiponectin. *Biochem J* 425(1): 41-52.
- Liu, M., Zhou, L., Xu, A., Lam, K.S.L., Wetzell, M.D., Xiang, R., Zhang, J., Xin, X., Dong, L.Q. and Liu, F. (2008b). A disulfide-bond A oxidoreductase-like protein (DsbA-L) regulates adiponectin multimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(47): 18302-18307.
- Liu, N. and Bassel-Duby, R. (2015). Regulation of skeletal muscle development and disease by microRNAs. *Results Probl Cell Differ* 56:165-90.
- Liu, X., Feng, J., Tang, L., Liao, L., Xu, Q. and Zhu, S. (2015b). The regulation and function of miR-21-FOXO3a-miR-34b/c signaling in breast cancer. *Int J Mol Sci* 16(2): 3148-62. doi: 10.3390/ijms16023148.
- Ma, F., Liu, X., Li, D., Wang, P., Li, N., Lu, L. and Cao, X. (2010). MicroRNA-4661 upregulates IL-10 expression in TLR-triggered macrophages by antagonizing RNA-binding protein tristetraprolin-mediated IL-10 mRNA degradation. *J Immunol* 184(11): 6053-9.
- Ma, Z., Qi, J., Meng, S., Wen, B. and Zhang, J. (2013). Swimming exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves microRNAs and synergistic regulation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Eur J Appl Physiol* 113(10): 2473-86.
- Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. and Matsubara, K. (1996). cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 221(2): 286-9.
- Mahfouz, R., Khoury, R., Blachnio-Zabielska, A., Turban, S., Loiseau, N., Lipina, C., Stretton, C., Bourron, O., Ferre, P., Fougelle, F., Hundal, H.S. and Hajdich, E. (2014). Characterising the inhibitory actions of ceramide upon insulin signaling in different skeletal muscle cell models: a mechanistic insight. *PLoS One* 9(7): e101865.
- Mao, X., Kikani, C.K., Riojas, R.A., Langlais, P., Wang, L., Ramos, F.J., Fang, Q., Christ-Roberts, C.Y., Hong, J.Y., Kim, R.-Y., Liu, F. and Dong, L.Q. (2006). APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nat Cell Biol* 8(5): 516-523.
- Marchesini, G. and Forlani, G. (2002). NASH: from liver diseases to metabolic disorders and back to clinical hepatology. *Hepatology* 35(2): 497-9.
- Marinho, R., Ropelle, E.R., Cintra, D.E., De Souza, C.T., Da Silva, A.S., Bertoli, F.C., Colantonio, E., D'Almeida, V. and Pauli, J.R. (2012). Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss. *J Cell Physiol* 227(7): 2917-26.
- Maroney, P.A., Yu, Y. and Nilsen, T.W. (2006). MicroRNAs, mRNAs, and translation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71:531-5.
- McAinch, A.J., Steinberg, G.R., Mollica, J., O'Brien, P.E., Dixon, J.B., Macaulay, S.L., Kemp, B.E. and Cameron-Smith, D. (2006). Differential regulation of

- adiponectin receptor gene expression by adiponectin and leptin in myotubes derived from obese and diabetic individuals. *Obesity* 14(11): 1898-1904.
- McCarthy, J.J. and Esser, K.A. (2007). MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* (1985) 102(1): 306-13.
- McCarthy, J.J., Esser, K.A., Peterson, C.A. and Dupont-Versteegden, E.E. (2009). Evidence of MyomiR network regulation of  $\beta$ -myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy. *Physiol Genomics* 39(3): 219-226.
- Menendez, P., Padilla, D., Villarejo, P., Palomino, T., Nieto, P., Menendez, J.M. and Rodriguez-Montes, J.A. (2013). Prognostic implications of serum microRNA-21 in colorectal cancer. *J Surg Oncol.* 108(6): 369-73. doi: 10.1002/jso.23415. Epub 2013 Aug 23.
- Miao, W., Bao, T.H., Han, J.H., Yin, M., Yan, Y., Wang, W.W. and Zhu, Y.H. (2015). Voluntary exercise prior to traumatic brain injury alters miRNA expression in the injured mouse cerebral cortex. *Braz J Med Biol Res* 48(5): 433-9.
- Mikines, K.J., Dela, F., Tronier, B. and Galbo, H. (1989). Effect of 7 days of bed rest on dose-response relation between plasma glucose and insulin secretion. *Am J Physiol* 257(1): 43-48.
- Miranda, P.J., DeFronzo, R.A., Califf, R.M. and Guyton, J.R. (2005). Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *Am Heart J* 149(1): 33-45.
- Mitsuuchi, Y., Johnson, S.W., Sonoda, G., Tanno, S., Golemis, E.A. and Testa, J.R. (1999). Identification of a chromosome 3p14.3-21.1 gene, APPL, encoding an adaptor molecule that interacts with the oncoprotein-serine/threonine kinase AKT2. *Oncogene* 18(35): 4891-8.
- Mojtahedi, S., Kordi, M.-R., Soleimani, M. and Hosseini, S.E. (2012). Effect of Different Intensities of Short Term Aerobic Exercise on Expression of miR-124 in the Hippocampus of Adult Male Rats. *Zahedan J Res Med Sci* 14(2): 16-20.
- Monteys, A.M., Spengler, R.M., Wan, J., Tecedor, L., Lennox, K.A., Xing, Y. and Davidson, B.L. (2010). Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *Rna* 16(3): 495-505.
- Mooren, F.C., Viereck, J., Kruger, K. and Thum, T. (2014). Circulating microRNAs as potential biomarkers of aerobic exercise capacity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306(4): 557-563.
- Morris, J.N. (1955). Uses of Epidemiology. *British Medical Journal* 2(4936): 395-401.
- Moschen, A.R., Wieser, V. and Tilg, H. (2012). Adiponectin: key player in the adipose tissue-liver crosstalk. *Curr Med Chem* 19(32): 5467-73.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. and Sato, J. (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 42(9): 3858-63.
- Nakano, Y., Tobe, T., Choi-Miura, N.H., Mazda, T. and Tomita, M. (1996). Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem* 120(4): 803-12.
- Nakasa, T., Ishikawa, M., Shi, M., Shibuya, H., Adachi, N. and Ochi, M. (2010). Acceleration of muscle regeneration by local injection of muscle-specific microRNAs in rat skeletal muscle injury model. *J Cell Mol Med* 14(10): 2495-505.
- Nassis, G.P., Papantakou, K., Skenderi, K., Triandafillopoulou, M., Kavouras, S.A., Yannakoulia, M., Chrousos, G.P. and Sidossis, L.S. (2005). Aerobic exercise training improves insulin sensitivity without changes in body weight, body fat, adiponectin, and inflammatory markers in overweight and obese girls. *Metabolism* 54(11): 1472-9.

- Nervi, C., Benedetti, L., Minasi, A., Molinaro, M. and Adamo, S. (1995). Arginine-vasopressin induces differentiation of skeletal myogenic cells and up-regulation of myogenin and Myf-5. *Cell Growth Differ* 6(1): 81-9.
- Nielsen, S., Scheele, C., Yfanti, C., Akerstrom, T., Nielsen, A.R., Pedersen, B.K. and Laye, M.J. (2010). Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. *J Physiol* 588(20): 4029-4037.
- O'Carroll, D. and Schaefer, A. (2013). General Principles of miRNA Biogenesis and Regulation in the Brain. *Neuropsychopharmacol* 38(1): 39-54.
- O'Leary, V.B., Marchetti, C.M., Krishnan, R.K., Stetzer, B.P., Gonzalez, F. and Kirwan, J.P. (2006). Exercise-induced reversal of insulin resistance in obese elderly is associated with reduced visceral fat. *J Appl Physiol* (1985) 100(5): 1584-9.
- Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M. and Lai, E.C. (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* 130(1): 89-100.
- Ordelleide, A.M., Heni, M., Gommer, N., Gasse, L., Haas, C., Guirguis, A., Machicao, F., Haring, H.U. and Staiger, H. (2011). The myocyte expression of adiponectin receptors and PPARdelta is highly coordinated and reflects lipid metabolism of the human donors. *Exp Diabetes Res* 2011(692536): doi: 10.1155/2011/692536.
- Organization, W.H. (2009). Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva: World Health Organization.
- Orom, U.A., Nielsen, F.C. and Lund, A.H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* 30(4): 460-71.
- Ouchi, N., Ohishi, M., Kihara, S., Funahashi, T., Nakamura, T., Nagaretani, H., Kumada, M., Ohashi, K., Okamoto, Y., Nishizawa, H., Kishida, K., Maeda, N., Nagasawa, A., Kobayashi, H., Hiraoka, H., Komai, N., Kaibe, M., Rakugi, H., Ogiwara, T. and Matsuzawa, Y. (2003). Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. *Hypertension* 42(3): 231-4.
- Owen, N., Healy, G.N., Matthews, C.E. and Dunstan, D.W. (2010). Too Much Sitting: The Population-Health Science of Sedentary Behavior. *Exerci Sport Sci Rev* 38(3): 105-113.
- Pajvani, U.B., Hawkins, M., Combs, T.P., Rajala, M.W., Doebber, T., Berger, J.P., Wagner, J.A., Wu, M., Knopps, A., Xiang, A.H., Utzschneider, K.M., Kahn, S.E., Olefsky, J.M., Buchanan, T.A. and Scherer, P.E. (2004). Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* 279(13): 12152-12162.
- Pasiakos, S.M. and McClung, J.P. (2013). miRNA analysis for the assessment of exercise and amino acid effects on human skeletal muscle. *Adv Nutr* 4(4): 412-7.
- Pate, R.R., Pratt, M., Blair, S.N., Haskell, W.L., Macera, C.A., Bouchard, C., Buchner, D., Ettinger, W., Heath, G.W., King, A.C. and et al. (1995). Physical activity and public health. A recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. *Jama* 273(5): 402-7.
- Pedersen, L. and Hojman, P. (2012). Muscle-to-organ cross talk mediated by myokines. *Adipocyte* 1(3): 164-167.
- Phillips, B.E., Hill, D.S. and Atherton, P.J. (2012). Regulation of muscle protein synthesis in humans. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 15(1): 58-63.
- Pineiro, R., Iglesias, M.J., Gallego, R., Raghay, K., Eiras, S., Rubio, J., Dieguez, C., Gualillo, O., Gonzalez-Juanatey, J.R. and Lago, F. (2005). Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett* 579(23): 5163-9.

- Pinto, A., Di Raimondo, D., Tuttolomondo, A., Butta, C., Milio, G. and Licata, G. (2012). Effects of physical exercise on inflammatory markers of atherosclerosis. *Curr Pharm Des* 18(28): 4326-4349.
- Polak, J., Klimcakova, E., Moro, C., Viguerie, N., Berlan, M., Hejnova, J., Richterova, B., Kraus, I., Langin, D. and Stich, V. (2006). Effect of aerobic training on plasma levels and subcutaneous abdominal adipose tissue gene expression of adiponectin, leptin, interleukin 6, and tumor necrosis factor alpha in obese women. *Metabolism* 55(10): 1375-81.
- Polyzos, S.A., Kountouras, J., Papatheodorou, A., Katsiki, E., Patsiaoura, K., Zafeiriadou, E., Papadopoulou, E., Zavos, C. and Terpos, E. (2013). Adipocytokines and cytokeratin-18 in patients with nonalcoholic fatty liver disease: Introduction of CHA index. *Ann Hepatol* 12(5): 749-57.
- Polyzos, S.A., Toulis, K.A., Goulis, D.G., Zavos, C. and Kountouras, J. (2011). Serum total adiponectin in nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Metabolism* 60(3): 313-26.
- Prabu, P., Rome, S., Sathishkumar, C., Aravind, S., Mahalingam, B., Shanthirani, C.S., Gastebois, C., Villard, A., Mohan, V. and Balasubramanyam, M. (2015). Circulating MiRNAs of 'Asian Indian Phenotype' Identified in Subjects with Impaired Glucose Tolerance and Patients with Type 2 Diabetes. *PLoS One* 10(5): e0128372.
- Pratesi, A., Tarantini, F. and Di Bari, M. (2013). Skeletal muscle: an endocrine organ. *Clin Cases Miner Bone Metab* 10(1): 11-14.
- Preiss, D. and Sattar, N. (2008). Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. *Clin Sci (Lond)*. 115(5): 141-50. doi: 10.1042/CS20070402.
- Qi, L., Saberi, M., Zmuda, E., Wang, Y., Altarejos, J., Zhang, X., Dentin, R., Hedrick, S., Bandyopadhyay, G., Hai, T., Olefsky, J. and Montminy, M. (2009). Adipocyte CREB Promotes Insulin Resistance in Obesity. *Cell Metabolism* 9(3): 277-286.
- Quaresma, P.G., Reencober, N., Zanutto, T.M., Santos, A.C., Weissmann, L., de Matos, A.H., Lopes-Cendes, I., Folli, F., Saad, M.J. and Prada, P.O. (2015). Pioglitazone treatment increases food intake and decreases energy expenditure partially via hypothalamic adiponectin/adipoR1/AMPK pathway. *Int J Obes* 31(10): doi: 10.1038.
- Ranscht, B. and Dours-Zimmermann, M.T. (1991). T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region. *Neuron* 7(3): 391-402.
- Rao, P.K., Kumar, R.M., Farkhondeh, M., Baskerville, S. and Lodish, H.F. (2006). Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(23): 8721-6.
- Rasmussen, M.S., Lihn, A.S., Pedersen, S.B., Bruun, J.M., Rasmussen, M. and Richelsen, B. (2006). Adiponectin receptors in human adipose tissue: effects of obesity, weight loss, and fat depots. *Obesity* 14(1): 28-35.
- Rector, R.S. and Thyfault, J.P. (2011). Does physical inactivity cause nonalcoholic fatty liver disease? *J Appl Physiol* 111(6): 1828-1835.
- Rector, R.S., Thyfault, J.P., Laye, M.J., Morris, R.T., Borengasser, S.J., Uptergrove, G.M., Chakravarthy, M.V., Booth, F.W. and Ibdah, J.A. (2008). Cessation of daily exercise dramatically alters precursors of hepatic steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *J Physiol* 586(17): 4241-4249.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R. and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403(6772): 901-6.

- Reyes-Herrera, P.H. and Ficarra, E. (2012). One decade of development and evolution of microRNA target prediction algorithms. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 10(5): 254-63.
- Rezen, T., Kovanda, A., Eiken, O., Mekjavic, I.B. and Rogelj, B. (2014). Expression changes in human skeletal muscle miRNAs following 10 days of bed rest in young healthy males. *Acta Physiol* 210(3): 655-666.
- Rhodes, R.E., Mark, R.S. and Temmel, C.P. (2012). Adult Sedentary Behavior: A Systematic Review. *American Journal of Preventive Medicine* 42(3): e3-e28.
- Riddell, M.C. (2008). The endocrine response and substrate utilization during exercise in children and adolescents. *J Appl Physiol* 105(2): 725-733.
- Ringholm, S., Bienso, R.S., Kiilerich, K., Guadalupe-Grau, A., Aachmann-Andersen, N.J., Saltin, B., Plomgaard, P., Lundby, C., Wojtaszewski, J.F., Calbet, J.A. and Pilegaard, H. (2011). Bed rest reduces metabolic protein content and abolishes exercise-induced mRNA responses in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301(4): 649-658.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L. and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14(10a): 1902-10.
- Romaine, S.P., Tomaszewski, M., Condorelli, G. and Samani, N.J. (2015). MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. *Heart* 101(12): 921-8.
- Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H. and Ward, T.G. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 84(3): 570-3.
- Rudwill, F., Blanc, S., Gauquelin-Koch, G., Chouker, A., Heer, M., Simon, C. and Bergouignan, A. (2013). Effects of different levels of physical inactivity on plasma visfatin in healthy normal-weight men. *Appl Physiol Nutr Metab* 38(6): 689-93. doi: 10.1139/apnm-2012-0434. Epub 2013 Mar 8.
- Russell, A.P., Lamon, S., Boon, H., Wada, S., Guller, I., Brown, E.L., Chibalin, A.V., Zierath, J.R., Snow, R.J., Stepto, N., Wadley, G.D. and Akimoto, T. (2013). Regulation of miRNAs in human skeletal muscle following acute endurance exercise and short-term endurance training. *J Physiol* 591(Pt 18): 4637-53.
- Rutkowski, J.M., Halberg, N., Wang, Q.A., Holland, W.L., Xia, J.Y. and Scherer, P.E. (2014). Differential transendothelial transport of adiponectin complexes. *Cardiovasc Diabetol* 1347.
- Safdar, A., Abadi, A., Akhtar, M., Hettinga, B.P. and Tarnopolsky, M.A. (2009). miRNA in the regulation of skeletal muscle adaptation to acute endurance exercise in C57Bl/6J male mice. *PLoS One* 4(5): e5610.
- Sandri, M. (2008). Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)* 23160-70.
- Sartorelli, V. and Fulco, M. (2004). Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy. *Sci STKE* 2004(244): re11.
- Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G. and Lodish, H.F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270(45): 26746-9.
- Schnall-Levin, M., Zhao, Y., Perrimon, N. and Berger, B. (2010). Conserved microRNA targeting in *Drosophila* is as widespread in coding regions as in 3'UTRs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(36): 15751-6.
- Schraw, T., Wang, Z.V., Halberg, N., Hawkins, M. and Scherer, P.E. (2008). Plasma adiponectin complexes have distinct biochemical characteristics. *Endocrinology* 149(5): 2270-82.
- Sedentary Behaviour Research, N. (2012). Letter to the editor: standardized use of the terms "sedentary" and "sedentary". *Appl Physiol Nutr Metab* 37(3): 540-542.

- Semlitsch, T., Jeitler, K., Hemkens, L.G., Horvath, K., Nagele, E., Schuermann, C., Pignitter, N., Herrmann, K.H., Waffenschmidt, S. and Siebenhofer, A. (2013). Increasing physical activity for the treatment of hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Sports Med* 43(10): 1009-23.
- Serino, G., Pesce, F., Sallustio, F., De Palma, G., Cox, S.N., Curci, C., Zaza, G., Lai, K.N., Leung, J.C., Tang, S.C., Papagianni, A., Stangou, M., Goumenos, D., Gerolymos, M., Takahashi, K., Yuzawa, Y., Maruyama, S., Imai, E. and Schena, F.P. (2015). In a retrospective international study, circulating miR-148b and let-7b were found to be serum markers for detecting primary IgA nephropathy. *Kidney Int* 18(10): 333.
- Shadid, S., Stehouwer, C.D. and Jensen, M.D. (2006). Diet/Exercise versus pioglitazone: effects of insulin sensitization with decreasing or increasing fat mass on adipokines and inflammatory markers. *J Clin Endocrinol Metab* 91(9): 3418-25.
- Shapiro, L. and Scherer, P.E. (1998). The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol* 8(6): 335-8.
- Shehzad, A., Iqbal, W., Shehzad, O. and Lee, Y.S. (2012). Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases. *Hormones (Athens)* 11(1): 8-20.
- Sigal, R.J., Kenny, G.P., Wasserman, D.H., Castaneda-Sceppa, C. and White, R.D. (2006). Physical activity/exercise and type 2 diabetes: a consensus statement from the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 29(6): 1433-8.
- Simonen, R.L., Rankinen, T., Perusse, L., Rice, T., Rao, D.C., Chagnon, Y. and Bouchard, C. (2003). Genome-wide linkage scan for physical activity levels in the Quebec Family study. *Med Sci Sports Exerc* 35(8): 1355-9.
- Simons, P.J., van den Pangaart, P.S., Aerts, J.M.F.G. and Boon, L. (2007). Pro-inflammatory delipidizing cytokines reduce adiponectin secretion from human adipocytes without affecting adiponectin oligomerization. *J Endocrinol* 192(2): 289-299.
- Simpson, K.A. and Singh, M.A. (2008). Effects of exercise on adiponectin: a systematic review. *Obesity* 16(2): 241-256.
- Soci, U.P., Fernandes, T., Hashimoto, N.Y., Mota, G.F., Amadeu, M.A., Rosa, K.T., Irigoyen, M.C., Phillips, M.I. and Oliveira, E.M. (2011). MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. *Physiol Genomics* 43(11): 665-73.
- Spornraft, M., Kirchner, B., Haase, B., Benes, V., Pfaffl, M.W. and Riedmaier, I. (2014). Optimization of extraction of circulating RNAs from plasma--enabling small RNA sequencing. *PLoS One* 9(9): e107259.
- Storgaard, H., Poulsen, P., Ling, C., Groop, L. and Vaag, A.A. (2007). Relationships of plasma adiponectin level and adiponectin receptors 1 and 2 gene expression to insulin sensitivity and glucose and fat metabolism in monozygotic and dizygotic twins. *J Clin Endocrinol Metab* 92(7): 2835-9.
- Stubbs, R.J., Harbron, C.G., Murgatroyd, P.R. and Prentice, A.M. (1995). Covert manipulation of dietary fat and energy density: effect on substrate flux and food intake in men eating ad libitum. *Am J Clin Nutr.* 62(2): 316-329.
- Sulistyoningrum, D.C., Gasevic, D., Lear, S.A., Ho, J., Mente, A. and Devlin, A.M. (2013). Total and high molecular weight adiponectin and ethnic-specific differences in adiposity and insulin resistance: a cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol* 12(170): doi: 10.1186.
- Swarbrick, M.M. and Havel, P.J. (2008). Physiological, pharmacological, and nutritional regulation of circulating adiponectin concentrations in humans. *Metab Syndr Relat Disord* 6(2): 87-102.



- Symons, T.B., Sheffield-Moore, M., Chinkes, D.L., Ferrando, A.A. and Paddon-Jones, D. (2009). Artificial gravity maintains skeletal muscle protein synthesis during 21 days of simulated microgravity. *J Appl Physiol* 107(1): 34-38.
- Tabata, I., Suzuki, Y., Fukunaga, T., Yokozeki, T., Akima, H. and Funato, K. (1999). Resistance training affects GLUT-4 content in skeletal muscle of humans after 19 days of head-down bed rest. *J Appl Physiol* 86(3): 909-914.
- Takahashi, M., Arita, Y., Yamagata, K., Matsukawa, Y., Okutomi, K., Horie, M., Shimomura, I., Hotta, K., Kuriyama, H., Kihara, S., Nakamura, T., Yamashita, S., Funahashi, T. and Matsuzawa, Y. (2000). Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24(7): 861-8.
- Terzis, G., Georgiadis, G., Stratakos, G., Vogiatzis, I., Kavouras, S., Manta, P., Mascher, H. and Blomstrand, E. (2008). Resistance exercise-induced increase in muscle mass correlates with p70S6 kinase phosphorylation in human subjects. *Eur J Appl Physiol* 102(2): 145-52.
- Thorp, A.A., Owen, N., Neuhaus, M. and Dunstan, D.W. (2011). Sedentary Behaviors and Subsequent Health Outcomes in Adults: A Systematic Review of Longitudinal Studies, 1996–2011. *Am J Prev Med* 41(2): 207-215.
- Tipton, C.M. (2014). The history of "Exercise Is Medicine" in ancient civilizations. *Adv Physiol Educ* 38(2): 109-17.
- Tomas, E., Kelly, M., Xiang, X., Tsao, T.S., Keller, C., Keller, P., Luo, Z., Lodish, H., Saha, A.K., Unger, R. and Ruderman, N.B. (2004). Metabolic and hormonal interactions between muscle and adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 63(2): 381-5.
- Tonevitsky, A.G., Maltseva, D.V., Abbasi, A., Samatov, T.R., Sakharov, D.A., Shkurnikov, M.U., Lebedev, A.E., Galatenko, V.V., Grigoriev, A.I. and Northoff, H. (2013). Dynamically regulated miRNA-mRNA networks revealed by exercise. *BMC Physiol* 13(9): doi: 10.1186.
- Trudel, G., Payne, M., Madler, B., Ramachandran, N., Lecompte, M., Wade, C., Biolo, G., Blanc, S., Hughson, R., Bear, L. and Uthoff, H.K. (2009). Bone marrow fat accumulation after 60 days of bed rest persisted 1 year after activities were resumed along with hemopoietic stimulation: the Women International Space Simulation for Exploration study. *J Appl Physiol* 107(2): 540-548.
- Trujillo, M.E. and Scherer, P.E. (2005). Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med* 257(2): 167-75.
- Uhlemann, M., Mobius-Winkler, S., Fikenzer, S., Adam, J., Redlich, M., Mohlenkamp, S., Hilberg, T., Schuler, G.C. and Adams, V. (2014). Circulating microRNA-126 increases after different forms of endurance exercise in healthy adults. *Eur J Prev Cardiol* 21(4): 484-91.
- Van Berendoncks, A.M. and Conraads, V.M. (2011). Functional adiponectin resistance and exercise intolerance in heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 8(2): 113-22.
- Van Berendoncks, A.M., Garnier, A., Beckers, P., Hoymans, V.Y., Possemiers, N., Fortin, D., Martinet, W., Van Hoof, V., Vrints, C.J., Ventura-Clapier, R. and Conraads, V.M. (2010). Functional adiponectin resistance at the level of the skeletal muscle in mild to moderate chronic heart failure. *Circ Heart Fail* 3(2): 185-194.
- Van Berendoncks, A.M., Garnier, A., Beckers, P., Hoymans, V.Y., Possemiers, N., Fortin, D., Van Hoof, V., Dewilde, S., Vrints, C.J., Ventura-Clapier, R. and Conraads, V.M. (2011). Exercise training reverses adiponectin resistance in skeletal muscle of patients with chronic heart failure. *Heart* 97(17): 1403-9.
- 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(7): RESEARCH0034.

- Vasudevan, S., Tong, Y. and Steitz, J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318(5858): 1931-4.
- Vlachos, I.S., Zagganas, K., Paraskevopoulou, M.D., Georgakilas, G., Karagkouni, D., Vergoulis, T., Dalamagas, T. and Hatzigeorgiou, A.G. (2015). DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res* 43(1): 460-466.
- Wagner, A., Simon, C., Ducimetiere, P., Montaye, M., Bongard, V., Yarnell, J., Bingham, A., Hedelin, G., Amouyel, P., Ferrieres, J., Evans, A. and Arveiler, D. (2001). Leisure-time physical activity and regular walking or cycling to work are associated with adiposity and 5 y weight gain in middle-aged men: the PRIME Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25(7): 940-8.
- Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T. and Kim, Y.Y. (2010). MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta* 1803(11): 1231-43.
- Wang, F., Ying, H., He, B., Pan, Y., Sun, H. and Wang, S. (2015a). Circulating miR-148/152 family as potential biomarkers in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol* 33.
- Wang, G., Cao, X., Lai, S., Luo, X., Feng, Y., Wu, J., Ning, Q., Xia, X., Wang, J., Gong, J. and Hu, J. (2015b). Altered p53 regulation of miR-148b and p53PIK contributes to tumor progression in colorectal cancer. *Oncogene* 34(7): 912-921.
- Wang, Y., Lam, K.S., Yau, M.H. and Xu, A. (2008). Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochem J* 409(3): 623-33.
- Wang, Z.V., Schraw, T.D., Kim, J.-Y., Khan, T., Rajala, M.W., Follenzi, A. and Scherer, P.E. (2007). Secretion of the Adipocyte-Specific Secretory Protein Adiponectin Critically Depends on Thiol-Mediated Protein Retention. *Mol Cell Biol* 27(10): 3716-3731.
- Wells, G.D., Selvadurai, H. and Tein, I. (2009). Bioenergetic provision of energy for muscular activity. *Paediatr Respir Rev* 10(3): 83-90.
- Westholm, J.O. and Lai, E.C. (2011). Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie* 93(11): 1897-904.
- WHO (2010). Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. Global Recommendations on Physical Activity for Health.
- Williams, A.E. (2008). Functional aspects of animal microRNAs. *Cell Mol Life Sci* 65(4): 545-62.
- Wilmore, J.H., Costill, D.L. and Kenney, W.L. (2009). *Physiologie du sport et de l'exercice*. Bruxelles.
- Wilmot, E.G., Edwardson, C.L., Achana, F.A., Davies, M.J., Gorely, T., Gray, L.J., Khunti, K., Yates, T. and Biddle, S.J. (2012). Sedentary time in adults and the association with diabetes, cardiovascular disease and death: systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* 55(11): 2895-905.
- Wiseman, M. (2008). The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *Proc Nutr Soc* 67(3): 253-6.
- Wu, X., Motoshima, H., Mahadev, K., Stalker, T.J., Scalia, R. and Goldstein, B.J. (2003). Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes* 52(6): 1355-63.
- Xu, T., Liu, Q., Yao, J., Dai, Y., Wang, H. and Xiao, J. (2015). Circulating microRNAs in response to exercise. *Scand J Med Sci Sports* 25(2): 149-154.
- Yadav, A., Kataria, M.A., Saini, V. and Yadav, A. (2013). Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clinica Chimica Acta* 41780-84.

- Yaffe, D. (1968). Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61(2): 477-83.
- Yamauchi, T., Hara, K., Kubota, N., Terauchi, Y., Tobe, K., Froguel, P., Nagai, R. and Kadowaki, T. (2003a). Dual roles of adiponectin/Acrp30 in vivo as an anti-diabetic and anti-atherogenic adipokine. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 3(4): 243-54.
- Yamauchi, T., Iwabu, M., Okada-Iwabu, M. and Kadowaki, T. (2014). Adiponectin receptors: A review of their structure, function and how they work. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 28(1): 15-23.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, N.H., Shibata, Y., Terauchi, Y., Froguel, P., Tobe, K., Koyasu, S., Taira, K., Kitamura, T., Shimizu, T., Nagai, R. and Kadowaki, T. (2003b). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423(6941): 762-9.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai, R., Kahn, B.B. and Kadowaki, T. (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8(11): 1288-95.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Akanuma, Y., Gavrilova, O., Vinson, C., Reitman, M.L., Kagechika, H., Shudo, K., Yoda, M., Nakano, Y., Tobe, K., Nagai, R., Kimura, S., Tomita, M., Froguel, P. and Kadowaki, T. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 7(8): 941-6.
- Yamauchi, T., Nio, Y., Maki, T., Kobayashi, M., Takazawa, T., Iwabu, M., Okada-Iwabu, M., Kawamoto, S., Kubota, N., Kubota, T., Ito, Y., Kamon, J., Tsuchida, A., Kumagai, K., Kozono, H., Hada, Y., Ogata, H., Tokuyama, K., Tsunoda, M., Ide, T., Murakami, K., Awazawa, M., Takamoto, I., Froguel, P., Hara, K., Tobe, K., Nagai, R., Ueki, K. and Kadowaki, T. (2007). Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 13(3): 332-339.
- Yang, W.S., Lee, W.J., Funahashi, T., Tanaka, S., Matsuzawa, Y., Chao, C.L., Chen, C.L., Tai, T.Y. and Chuang, L.M. (2001). Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 86(8): 3815-9.
- Yang, Z., Cappello, T. and Wang, L. (2015). Emerging role of microRNAs in lipid metabolism. *Acta Pharm Sin B* 5(2): 145-150.
- Yau, S.Y., Li, A., Hoo, R.L., Ching, Y.P., Christie, B.R., Lee, T.M., Xu, A. and So, K.F. (2014). Physical exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects are mediated by the adipocyte hormone adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(44): 15810-5.
- Zacharewicz, E., Lamon, S. and Russell, A.P. (2013). MicroRNAs in skeletal muscle and their regulation with exercise, ageing, and disease. *Front Physiol* 4(266): 266.
- Zappalà, G. and Rechler, M.M. (2009). IGFBP-3, hypoxia and TNF- $\alpha$  inhibit adiponectin transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 382(4): 785-789.
- Zderic, T.W. and Hamilton, M.T. (2006). Physical inactivity amplifies the sensitivity of skeletal muscle to the lipid-induced downregulation of lipoprotein lipase activity. *J Appl Physiol* 100(1): 249-257.
- Zeng, Q., Isobe, K., Fu, L., Ohkoshi, N., Ohmori, H., Takekoshi, K. and Kawakami, Y. (2007). Effects of exercise on adiponectin and adiponectin receptor levels in rats. *Life Sci* 80(5): 454-9.

- Zeng, Y. and Cullen, B.R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res* 32(16): 4776-85.
- Zhang, K., Kang, D.K., Ali, M.M., Liu, L., Labanieh, L., Lu, M., Riazifar, H., Nguyen, T.N., Zell, J.A., Digman, M.A., Gratton, E., Li, J. and Zhao, W. (2015). Digital quantification of miRNA directly in plasma using integrated comprehensive droplet digital detection. *Lab Chip* 21.
- Zhao, G., Zhang, J.G., Liu, Y., Qin, Q., Wang, B., Tian, K., Liu, L., Li, X., Niu, Y., Deng, S.C. and Wang, C.Y. (2013). miR-148b functions as a tumor suppressor in pancreatic cancer by targeting AMPK $\alpha$ 1. *Mol Cancer Ther* 12(1): 83-93.
- Zhao, Y. and Srivastava, D. (2007). A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci* 32(4): 189-197.
- Zschucke, E., Gaudlitz, K. and Strohle, A. (2013). Exercise and physical activity in mental disorders: clinical and experimental evidence. *J Prev Med Public Health* 46(Suppl 1): 12-21.



# ANNEXES



## Annexe 1. Ligne de code du programme de sélection de microARNs stables.

*Adapté de (Vandesompele et al. 2002)*

```
filnavn="Nom_table.csv" # substitute your own file name

x=scan(pucenorm2)
k=x[1] # number of genes
x=x[-1]
n=length(x)/(k+1) # number of samples
da=matrix(x,(k+1),,byrow=T)
gr=da[k+1,] # group identifier
da=da[1:k,] # pcr values

m=1
medgr=c(gr[1])
for (i in 2:n){
a=sum(medgr==gr[i])
if (a==0){
m=m+1
medgr=c(medgr,gr[i])
}
} # on exit m is the number of groups and medgr are the group labels

medgen=c(1:k) # all genes are included in the analysis

y1=log(da) # log of pcr values

y=y1[medgen,gr==(medgr[1])]
for (i in 2:m){
y=cbind(y,y1[medgen,gr==(medgr[i])])
} # data rearranged according to group

ngr=rep(0,m) # number of samples in each group
for (i in 1:m){
ngr[i]=sum(gr==(medgr[i]))
}
grny=rep(c(1:m),ngr) # group labels for data in y
n=sum(ngr)

mei=apply(y,1,mean)
mej=apply(y,2,mean)
me=mean(mej)

# Estimates of the variances when group label is not considered
a=rep(0,k)
for (i in 1:k){
a[i]=sum((y[i,]-mej-me[i]+me)^2)/(n-1)}
b=sum(a)
varnogr=
(a-b/(k*k-k))/(1-2/k)

# Estimates of variances for the m groups and k genes

meigr=matrix(rep(0,k*m),k,m)
for (j in 1:m){
meigr[,j]=apply(y[,grny==j],1,mean)
}
megr=rep(0,m)
for (j in 1:m){
```



```

megr[j]=mean(meigr[,j])
}

g=y
for (j in 1:n){
  g[,j]=y[,j]-meigr[,grny[j]]-mej[j]+megr[grny[j]]
}

vargroupall=matrix(rep(0,m*k),m,k)
for (j in 1:m){
  a=rep(0,k)
  for (i in 1:k){
    a[i]=sum((g[i,grny==j])^2)/(ngr[j]-1)
    b=sum(a)
    vargroupall[j,]=(a-b/(k*k-k))/(1-2/k)
  }
}

varmin=vargroupall
for (i in 1:m){
  z=y[,grny==i]
  for (j in 1:k){
    varpair=rep(0,k)
    for (j1 in 1:k){
      varpair[j1]=var(z[j,]-z[j1,])
      varmin[i,j]=min(varpair[varpair>0])/4
    }
  }
}

vargroupall=ifelse(vargroupall<0,varmin,vargroupall)

# Variances have been estimated and corrected if negative values were encountered
# quality measure for each gene is calculated

dif=meigr
m1i=apply(dif,1,mean)
m1j=apply(dif,2,mean)
m1=mean(m1i)
for (i in 1:k){
  for (j in 1:m){
    dif[i,j]=dif[i,j]-m1i[i]-m1j[j]+m1
  }
}

va=vargroupall
for (j in 1:m){
  va[,j]=va[,j]/ngr[j]}

tau=sum(dif*dif)/((m-1)*(k-1))-mean(va)
tau=ifelse(tau<0,0,tau)
dnew=dif*tau/(tau+t(va))
vanew=t(va+tau*va/(tau+va))

qm=abs(dnew)+sqrt(vanew)
qmaal=apply(qm,1,mean)

cbind(c(1:k),qmaal) # gene number and quality measure
cbind(c(1:k)[order(qmaal)],qmaal[order(qmaal)]) # gene number and quality measure in
increasing order

# We now look for the best combination of the gene with the smallest
# value of the quality measure and one more gene

```

```

b=order(qmaal)[1]
qmaaldob=rep(0,k)
qmaaldob[b]=qmaal[b]*sqrt(k/(k-1))

```

```

for (j in c(1:k)[-b]){
a=c(b,j)
a1=dnew[a,]
a2=apply(a1,2,mean)*sqrt(k/(k-2))
b1=v anew[a,]
b2=apply(b1,2,mean)/2
qmaaldob[j]=mean(abs(a2)+sqrt(b2))
}

```

```

cbind(c(1:k),qmaaldob) # gene number and quality measure using best
# gene from before and one more gene

```

```

cbind(c(1:k)[order(qmaaldob)],qmaaldob[order(qmaaldob)])
# gene number and quality measure in increasing order using best
# gene from before and one more gene

```

Modification du script problème avec la gestion des données (valeurs manquantes)  
library(SLqPCR)

```

# Ajustement de la fonction geomMean, appelée ici geomMean1

```

```

geomMean1<-function (relData, na.rm = FALSE)
{ if (!is.numeric(relData) && !is.complex(relData) && !is.logical(relData)) {
  warning("argument is not numeric or logical: returning NA")
  return(as.numeric(NA))
}
if (any(relData < 0, na.rm=TRUE))      ## Cette ligne a été modifiée car il ne gèrait pas
                                     les NA : ajout de na.rm = TRUE
  stop("'x' contains negative value(s)")
if (na.rm)
  relData <- relData[!is.na(relData)]
return(prod(relData)^(1/length(relData)))
}

```

```

# Ajustement de la fonction selectHKgenes, appelée ici selectHKgenes1 dans laquelle
geomMean a été remplacée par geomMean1

```

```

selectHKgenes1<-function (relData, method = "Vandesompele", minNrHK = 2, geneSymbol,
  trace = TRUE, na.rm = FALSE)
{
  if (!is.matrix(relData) & !is.data.frame(relData))
    stop("'relData' needs to be of class matrix or data.frame")
  n <- ncol(relData)
  if (n < 3)
    stop("you need data from at least 3 genes")
  if (minNrHK >= n)
    stop("'minNrHK' must be smaller than 'ncol(relData)'")
  if (minNrHK < 2) {
    warning("'minNrHK' is set to 2")
    minNrHK <- 2
  }
}
if (length(geneSymbol) != n)
  stop("'geneSymbol' has wrong length")

```

```

if (method == "Vandesompele") {
  V <- numeric(n - minNrHK)
  names(V) <- paste(((n - 1):minNrHK), "/", (n:(minNrHK +
    1)), sep = "")
  meanM <- numeric(n - minNrHK + 1)
  names(meanM) <- as.character(n:minNrHK)
  R <- character(n)
  names(R) <- as.character(c(rep(1, minNrHK), (minNrHK +
    1):length(R)))
  for (i in n:minNrHK) {
    M <- geneStabM(relData, na.rm = na.rm)
    names(M) <- geneSymbol
    ind <- which.max(M)
    meanM[n - i + 1] <- mean(na.omit(M))
    if (i == minNrHK)
      R[1:minNrHK] <- geneSymbol
    else R[i] <- geneSymbol[ind]
    if (i > 2) {
      NF.old <- apply(relData, 1, geomMean1, na.rm = na.rm)
      NF.new <- apply(relData[, -ind], 1, geomMean1, na.rm = na.rm)
      V[n - i + 1] <- sd(log2(NF.new/NF.old), na.rm = TRUE)
    }
    if (trace) {
      cat("#####\n")
      cat("Step ", n - i + 1, ":\n")
      cat("gene expression stability values M:\n")
      print(sort(M))
      cat("average expression stability M:\t", meanM[n -
        i + 1], "\n")
      if (i > 2) {
        cat("gene with lowest stability (largest M value):\t",
          geneSymbol[ind], "\n")
        cat("Pairwise variation, (", i - 1, "/", i,
          "):\t", V[n - i + 1], "\n")
      }
    }
    relData <- relData[, -ind]
    geneSymbol <- geneSymbol[-ind]
  }
  return(list(ranking = R, variation = V, meanM = meanM))
}
else {
  stop("specified method not yet implemented")
}}

```

## ARTICLE ANNEXE

**Identification de microARNs circulants caractéristiques du « Phénotype Indien-Asiatique » chez des sujets présentant une intolérance au glucose et des patients avec un diabète de type 2.**

Circulating MiRNAs of 'Asian Indian Phenotype' Identified in Subjects with Impaired Glucose Tolerance and Patients with Type 2 Diabetes

Paramasivam Prabu, Sophie Rome, Chandrakumar Sathishkumar, Sankaramoorthy Aravind, Balakumar Mahalingam, Coimbatore Subramanian, **Caroline Gastebois**, Audrey Villard, Viswanathan Mohan, Muthuswamy Balasubramanyam

Publié : PLoS One 10(5), DOI: 10.1371, Mai 2015



RESEARCH ARTICLE

# Circulating MiRNAs of ‘Asian Indian Phenotype’ Identified in Subjects with Impaired Glucose Tolerance and Patients with Type 2 Diabetes

Paramasivam Prabu<sup>1</sup>, Sophie Rome<sup>2</sup>, Chandrakumar Sathishkumar<sup>1</sup>, Sankaramoorthy Aravind<sup>1</sup>, Balakumar Mahalingam<sup>1</sup>, Coimbatore Subramanian Shanthirani<sup>1</sup>, Caroline Gastebois<sup>2</sup>, Audrey Villard<sup>2</sup>, Viswanathan Mohan<sup>1</sup>, Muthuswamy Balasubramanyam<sup>1\*</sup>

**1** Madras Diabetes Research Foundation and Dr. Mohan’s Diabetes Specialities Centre, WHO Collaborating Centre for Non-Communicable Diseases Prevention and Control & IDF Centre of Education, Gopalapuram, Chennai-600086, India, **2** CarMeN Laboratory (INSERM 1060, INRA 1397, INSA), University of Lyon, Faculté de Médecine Lyon-Sud, Chemin du Grand Revoyet, 69600, Oullins, France

\* [diasignal@gmail.com](mailto:diasignal@gmail.com)



CrossMark  
click for updates

 OPEN ACCESS

**Citation:** Prabu P, Rome S, Sathishkumar C, Aravind S, Mahalingam B, Shanthirani CS, et al. (2015) Circulating MiRNAs of ‘Asian Indian Phenotype’ Identified in Subjects with Impaired Glucose Tolerance and Patients with Type 2 Diabetes. *PLoS ONE* 10(5): e0128372. doi:10.1371/journal.pone.0128372

**Academic Editor:** Ratna B. Ray, SAINT LOUIS UNIVERSITY, UNITED STATES

**Received:** February 14, 2015

**Accepted:** April 26, 2015

**Published:** May 28, 2015

**Copyright:** © 2015 Prabu et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** Authors acknowledge the financial support from the Department of Biotechnology (DBT), Government of India. This work was also supported by grants from the French Fondation pour la Recherche Médicale (FRM-20101220456) and is supported by the French—Indian medical research cooperation program between INSERM and ICMR. The authors thank the study participants, and the clinical assistants and administrative personnel at the

## Abstract

Several omics technologies are underway worldwide with an aim to unravel the pathophysiology of a complex phenotype such as type 2 diabetes mellitus (T2DM). While recent studies imply a clinically relevant and potential biomarker role of circulatory miRNAs in the etiology of T2DM, there is lack of data on this aspect in Indians—an ethnic population characterized to represent ‘Asian Indian phenotype’ known to be more prone to develop T2DM and cardiovascular disease than Europeans. We performed global serum miRNA profiling and the validation of candidate miRNAs by qRT-PCR in a cohort of subjects comprised of normal glucose tolerance (NGT), impaired glucose tolerance (IGT) and patients with T2DM. Our study revealed 4 differentially expressed miRNAs (miR-128, miR-130b-3p, miR-374a-5p, miR-423-5p) in subjects with IGT and T2DM patients compared to control subjects. They were positively or negatively correlated to cholesterol levels, HbA<sub>1c</sub>, HOMA-IR and fasting insulin. Interestingly, circulating level of miR-128 and miR-130b-3p were also altered in serum of diet-induced diabetic mice compared to control animals. Among the altered circulating miRNAs, miR-128 had never been described in previous studies/populations and appeared to be a ‘New Lead’ in Indians. It was positively correlated with cholesterol both in prediabetic subjects and in diet-induced diabetic mice, suggesting that its increased level might be associated with the development of dyslipidemia associated with T2DM. Our findings imply directionality towards biomarker potential of miRNAs in the prevention/diagnosis/treatment outcomes of diabetes.

Madras Diabetes Research Foundation, Chennai, India.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

South Asia forms one of the epicenters of the global diabetes epidemic. Over the past couple of decades, there has been a worrying increase in the prevalence rates of type 2 diabetes mellitus (T2DM) in the region and India in particular. The higher prevalence of diabetes in South Asians is least explained by traditionally measured risk factors. Insulin resistance and abnormalities of insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells are the main defects that lead to T2DM. The so called “Asian Indian Phenotype” refers to certain unique clinical and biochemical abnormalities in Indians which include increased insulin resistance, greater abdominal adiposity *i.e.*, higher waist circumference despite lower body mass index and T2DM occurring at a younger age than Caucasians [1,2]. South Asians are also characterized by a unique metabolic profile with higher insulin levels [3], a greater degree of insulin resistance [4] and a higher prevalence of diabetes [5]. Insulin resistance has been demonstrated in Asian Indians even during adolescence [6] and hyperinsulinemia seems to be present in Asian Indians even at birth [7]. More recent studies do imply that South Asians may have an early decline in  $\beta$ -cell functions as well [8,9,2].

Given the predicted explosion in the number of cases of prediabetes and T2DM worldwide and in India, continued research is essential, particularly in the newer areas such as application of microRNA (miRNA) technologies. MiRNAs are a class of evolutionally conserved non-coding RNAs of 19–22 nucleotides and function as negative regulators of gene expression [10]. Important roles of miRNAs have emerged in the control of metabolic pathways involved in lipid metabolism, adipocyte differentiation and pancreas development, energy homeostasis, glucose-stimulated insulin secretion and inflammation [11–16]. Recently, significant amounts of miRNAs have been found not only intracellularly, but in extracellular human body fluids (*e.g.*; serum, plasma, saliva, urine, tears, amniotic fluids and milk) [17–19]. They are remarkably stable despite high extracellular RNase activities. Extracellular miRNAs are enclosed in small membranous vesicles (*e.g.*; in exosomes, shedding vesicles, apoptotic bodies) or associated with, or packaged within high-density lipoprotein, or associated with RNA-binding proteins (*e.g.*; high-density lipoprotein, Argonaute 2 and nucleophosmin 1) [20–22]. Levels of miRNAs in the serum of humans have been shown to be stable, reproducible, consistent amongst healthy individuals and change during pathophysiology, allowing them to be of potential value as biomarkers of disease [23]. Recently, novel circulatory miRNA signatures have been studied and shown associated not only with the disease but also the severity of diseases such as various cancers, liver and cardiovascular diseases [24,25]. Whereas several studies have evaluated the role of miRNAs in cancer, much less is known in the field of diabetes. Differentially expressed circulatory miRNA signature characteristic of T2DM have been reported from recent studies outside the India based on the analysis of small group of subjects [26–33]. From these studies, it is expected that the identification of potential-specific biomarkers of miRNAs may help predict or detect the development and progression of diabetes and its complications at an early stage, and therefore allow timely intervention. However, there is lack of clinically relevant data on the potential of circulatory miRNAs in Indians, who are highly insulin resistant and more prone to develop T2DM and cardiovascular disease than Europeans [5]. While the health burden of T2DM is somehow associated with obesity as a co-morbidity in Caucasians, metabolic risk factors are either higher in Asian Indians independent of obesity or operate at a lower BMI threshold. Therefore, this study is aimed to identify circulating miRNAs that could be differentially expressed in subjects with prediabetes and patients with T2DM and to dissect out their potential biomarkers role in association with clinical parameters/conventional risk factors of T2DM.

## Research Design and Methods

### Recruitment of the Study Subjects

Subjects with NGT (Normal Glucose Tolerance,  $n = 49$ ), subjects with IGT (Impaired Glucose Tolerance,  $n = 47$ ) and patients with Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM,  $n = 49$ ) were recruited from Dr. Mohans' Diabetes Specialities Centre, Chennai and from the on-going epidemiological studies. The study was conducted according to the principles of Declaration of Helsinki and appropriate approval by the Institutional Ethics Committee of the Madras Diabetes Research Foundation. Ethics Committee approved written informed consent was obtained from all study subjects. NGT, IGT and T2DM were defined using World Health Organization consulting group criteria. Those who were confirmed by oral glucose tolerance test to have 2-hour plasma glucose value  $\geq 11.1$  mmol/L (200 mg/dL) or more based on World Health Organization consulting group criteria were diagnosed as diabetic patients. Those with 2-hour post glucose value  $\geq 7.8$  mmol/L (140 mg/dL) and  $< 11.1$  mmol/L (200 mg/dL) were diagnosed as subjects with IGT, and those with 2-hour post glucose value of less than 7.8 mmol/L (140 mg/dL) as subjects with NGT. To rule out the medication effects, all our T2DM subjects are of newly diagnosed nature.

### Anthropometric Measurements

Anthropometric measurements including height, weight and waist circumference were obtained using standardized techniques. Height was noted with a tape measured to the nearest centimeter. Weight was measured with traditional spring balance that was kept on a firm horizontal surface. The body mass index (BMI) was calculated using the formula, weight (kg)/height (m)<sup>2</sup>. Waist circumference was measured using a non stretchable fiber measuring tape. Blood pressure was recorded from the right arm of study subjects when they were relaxed and in sitting position to the nearest 2mm Hg with a mercury sphygmomanometer (Diamond Deluxe BP apparatus, Pune, India). Two reading were taken 5 min apart and the mean of the two was taken as the blood pressure.

### Biochemical Parameter Investigations

Fasting plasma glucose (glucose oxidase-peroxidase method), serum cholesterol (cholesterol oxidase-peroxidase-amidopyrine method), serum triglycerides (glycerol phosphate oxidase-peroxidase-amidopyrine method) and HDL cholesterol (direct method-polyethylene glycol-pretreated enzymes) were measured using Hitachi-912 Autoanalyser (Hitachi, Mannheim, Germany). The intra and inter assay co-efficient of variation for the biochemical assays were  $< 5\%$ . Low-density lipoprotein (LDL) cholesterol was calculated using Friedewald formula. Glycated hemoglobin (HbA1c) was estimated by high-pressure liquid chromatography using the variant analyzer (Bio-Rad, Hercules, Calif., USA). Serum Insulin was estimated using enzyme-linked immunosorbent assay (Calbiotech, CA). The intra-assay and the inter-assay coefficients of variation for insulin assay was  $< 10\%$ . Insulin resistance was calculated using the homeostasis assessment model (HOMA-IR) using the formula: {fasting insulin ( $\mu$ IU/mL) x fasting glucose (mmol/L)} / 22.5.

### Circulating RNA Extraction and Purification

Fasting serum sample (from 5 ml of blood) was obtained by standard venepuncture using VacutainerPlus Plastic Serum and SST Tubes (Becton-Dickinson, Franklin, lakes, NJ). The separation of the serum was performed by centrifugation at 4,000 rpm for 10 min, followed by 12000 rpm for 15 min to completely remove cell debris. Total RNA was isolated from 0.25 ml



**Table 1. Clinical and biochemical characteristics of the subjects involved in the study.**

Parameters	Whole cohort			Subgroup of subjects used to select candidate miRNAs		
	NGT	IGT	T2DM	NGT	IGT	T2DM
	(n = 49)	(n = 47)	(n = 49)	(n = 12)	(n = 12)	(n = 12)
Males/females	(26/23)	(23/24)	(25/24)	(6/6)	(6/6)	(5/7)
Age(years)	44.3 ± 6.9	44.1 ± 7.0	44.4 ± 8.1	38.5 ± 3.0	41.2 ± 4.0	40.2 ± 5.0
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	24.5 ± 2.6	24.9 ± 2.9	25.7 ± 3.5	23.1 ± 2.0	23.9 ± 1.0	26.7 ± 1.0
Fasting plasma glucose (mg/dl)	85 ± 11	<b>105 ± 18 *</b>	<b>146 ± 34*</b>	83 ± 7.0	<b>101 ± 7.0 *</b>	<b>150 ± 27 *</b>
2 hr plasma glucose (mg/dl)	96 ± 21	<b>166 ± 18*</b>	<b>269 ± 63*</b>	89 ± 24	<b>160 ± 20 *</b>	<b>264 ± 61 *</b>
HbA1c (%)	5.6 ± 0.4	<b>6.3 ± 0.8*</b>	<b>7.8 ± 1.6*</b>	5.2 ± 0.5	6.0 ± 0.5	<b>7.9 ± 1.0 *</b>
HOMA-IR	2.0 ± 1.1	<b>3.5 ± 1.4*</b>	<b>6.3 ± 1.8*</b>	1.5 ± 0.4	2.7 ± 1.0	<b>5.0 ± 3.0 *</b>
Serum Cholesterol (mg/dl)	170 ± 24	187 ± 35	185 ± 52	168 ± 29	185 ± 39	185 ± 52
Serum Triglycerides (mg/dl)	97 ± 38	148 ± 76	136 ± 62	119 ± 65	134 ± 69	148 ± 67
HDL cholesterol (mg/dl)	41.2 ± 9.0	40 ± 5.0	37 ± 7.0	41 ± 9.0	41 ± 10	40 ± 8.0
LDL cholesterol (mg/dl)	111 ± 22	117 ± 32	121 ± 46	107 ± 26	117 ± 33	115 ± 44
VLDL (mg/dl)	19 ± 7.6	30 ± 16	25 ± 13	24 ± 13	27 ± 14	29 ± 13
Fasting Insulin (µIU/ml)	7.6 ± 2.0	11 ± 4.0	13 ± 6.7	9.6 ± 4.6	<b>13.4 ± 4.6 *</b>	<b>17.8 ± 4.0 *</b>
Systolic blood pressure (mmHg)	117 ± 9.0	121 ± 12	124 ± 12	123 ± 20	124 ± 12	126 ± 16
Diastolic blood pressure (mmHg)	78 ± 10	82 ± 5.0	81 ± 7.0	80 ± 10	80 ± 8.0	84 ± 9
Waist circumference (cm)	87.1 ± 1.21	<b>93.8 ± 1.60*</b>	<b>92.3 ± 1.38*</b>	87.3 ± 8.4	<b>93.5 ± 10.9 *</b>	<b>92.3 ± 9.6 *</b>

All the value represents mean and ± standard deviation

\*p<0.05 compared control

ND, not determined

doi:10.1371/journal.pone.0128372.t001

of serum using Qiagen miRNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA) for RNA collection and purification according to the manufacturer's protocol. Total RNA was controlled using Nanodrop 2000 UV spectrophotometer and stored at -80°C until use.

### Global Serum microRNA Profiling

Global serum miRNA profiling was done in a discovery cohort comprised of 12 individuals each of NGT, IGT and T2DM (Table 1). To assess hemolysis two microRNAs were used. One that is expressed in red blood cells (miRNA-451), and one that is relatively stable in serum and plasma and not affected by hemolysis (miRNA-23a). The ratio between these two miRNAs correlates to degree of hemolysis. In our experience samples with ratios above 8.0 will have an increased risk of being affected by hemolysis. We validated that our samples had lower ratios and were not affected by hemolysis. Due to the low levels of microRNAs and potentially high levels of inhibitors in samples derived from serum/plasma which also differs from sample to sample, Exiqon protocol ([www.exiqon.com/serum-plasma-guidelines](http://www.exiqon.com/serum-plasma-guidelines)) recommends using RNA amounts based on starting volume rather than RNA quantity. 8 µL of eluted human plasma/serum RNA in a 40 µL RT reaction generally give a good signal with maximal miRNA detection in miRNA PCR panels [34]. Therefore in our study, 8 µl RNA was reverse transcribed in 40µl reactions using the miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR cDNA synthesis kit. An RNA spike-in control (Sp6) was added to the reverse transcription step. This control is used to confirm that the reverse transcription and amplification occurs with equal efficiency in all samples. cDNA was diluted 50x and assayed in 10 µl PCR reactions according to the protocol for miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR; each microRNA was assayed once by qPCR on

the microRNA Ready-to-Use PCR (miRCURY LNA microRNA Human panel I Exiqon). Negative controls excluding template from the reverse transcription reaction was performed and profiled like the samples. The amplification was performed in a LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche) in 384 well plates. The amplification curves were analyzed using the Roche LC software, both for determination of  $C_p$  (by the 2nd derivative method) and for melting curve analysis. Amplification efficiency was calculated using algorithms similar to the LinReg software. All assays were inspected for distinct melting curves and the  $T_m$  was checked to be within known specifications for the assay. Furthermore assays must be detected with 5  $C_p$ 's less than the negative control, and with  $C_p < 37$  to be included in the data analysis. Data that did not pass these criteria were omitted from any further analysis. Using NormFinder the best normalization procedure was found to be the average of assays detected in all samples. All data were normalized to the average of assays detected in all samples (average—assay  $C_p$ ). Comparison between groups were made by using the student  $t$ -test ( $p < 0.05$ ) on normalized data, to select the differentially expressed miRNAs.

### Validation of candidate miRNAs by individual qRT-PCR

miRNAs short listed as differentially expressed from the discovery set were revalidated in a larger cohort comprising of 145 individuals (50% men, 50% women) with NGT ( $n = 49$ ), IGT ( $n = 47$ ) and T2DM ( $n = 49$ ) by individual PCR assays. Total RNA from serum was extracted as described above and used for qRT-PCR by using the Universal miRCURY LNA microRNA PCR, Polyadenylation and cDNA synthesis kit II and the miRCURY LNA microRNA PCR system, Exilent SYBR green master mix, from Exiqon, on ABI 7000 Applied Biosystems thermocycler. Relative expression of microRNA expression was calculated by  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. We evaluated a suitable number of reference miRNAs, based on the increased expression stability [28]. However, we were unable to identify stable miRNAs that did not discriminate between male and female or that were not correlated with metabolic parameters, or that was not previously identified as relevant for the pathology in previous studies. This could be explained partly by the fact that inside the same group, women and men might differed in their level of cholesterol and triglycerides (S1 Table). Thus, in this study, data were normalised on the volume of total RNA that was used for qRT-PCR (*i.e.*; a fixed volume of 8  $\mu$ l).

### Statistical Methods

Statistical analyses were performed with the SPSS statistical software (SPSS V12.0, Inc., Chicago, IL), and the R Statistical Software (<http://www.r-project.org/>). ANOVA and/or paired  $t$ -tests were performed to study differences on quantitative variables between groups.

### Bioinformatic Analysis

Cellular pathway determination for each miRNA was done by using DIANA-miRPath (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=site/index>) which predicted target genes.

### Animals Maintenance, Preclinical Characterization and miRNA Profiling

Male C57BL/6J mice, 10–12 weeks old (body weight, 18–22 g) were obtained from Sri Venkateswara Enterprises (Bangalore) and maintained at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  under a 12-h light-dark cycle (lights on from 6:00 AM to 6:00 PM). All experiments were performed in accordance with regulations specified by the Committee for the Purpose of Control and Supervision on Experiments on Animals (CPCSEA), Government of India and approval by the Institutional Animal Ethical

Committee (IAEC) of the Madras Diabetes Research Foundation Chennai. Food (Nutrilab, Bangalore) and water were given *ad libitum* to the animals. High fat diet (57%) was procured from the National Institute of Nutrition, Hyderabad, India. After acclimatization, basal fasting plasma/serum biochemical markers were estimated. Mice were randomly divided into two groups *i.e.*, mice fed with normal pellet diet (NPD;  $n = 5$ ) and mice fed with high fat diet (HFD;  $n = 6$ ), with similar average body weight and plasma glucose on day 0. All groups were fed with respective diet and water *ad libitum* for 6 months. All biochemical and preclinical measurements were done as per the standard procedures (S2 Table). At the end of the protocol, HFD fed animals were characterized as glucose-intolerant and insulin-resistant by OGTT (Oral Glucose Tolerance Test) and ITT (Insulin Tolerance Test), respectively. Serum samples (0.25 ml) were used to quantify candidate miRNA by qRT-PCR as previously described.

## Results

In this study, we have analysed the expression of circulating microRNAs in serum of 145 non obese subjects (50% males and 50% females) suffering from T2DM ( $n = 49$ ) compared with controls ( $n = 49$ ) or pre-diabetic subjects ( $n = 47$ ). As shown on Table 1, both prediabetics (IGT) and patients with type 2 diabetes (T2DM) had poor glycemic control as reflected by significant higher fasting plasma glucose and 2 hr plasma glucose and higher HbA<sub>1c</sub> values compared with controls. Subjects with prediabetes and patients with type 2 diabetes exhibited significantly higher insulin resistance as revealed by HOMA-IR estimation. The lipid levels and blood pressure did not significantly differ among the 3 groups.

### Profiling of Circulating miRNA

Serum miRNA profiling was first performed on a subgroup of 36 subjects from the 145 subjects (50% males and 50% females). T2DM and IGT patients of this identification sample only differed clinically from control subjects in fasting glucose and 2 hr plasma glucose and in fasting insulin. Both T2DM and IGT patients had significantly higher waist circumference than the control group of subjects (Table 1). The global serum miRNA profiling (miRCURY LNA microRNA Human panel I V3-Exiqon) detected an average of ~159 miRNAs per sample of which 112 miRNAs were detected in all groups. As shown on S1 Fig, the majority of the 112 miRNAs were expressed in a similar way and hierarchical clustering of the data did not permit to discriminate between the 3 groups. Statistical data analysis revealed that the mean expression level of 9 miRNAs (*i.e.*; miR-128, miR-99b-5p, miR-130b-3p, miR-142-3p, miR-374a-5p, miR-423-5p, miR-484, miR-629-5p, let-7d-3p) was significantly different (student *t*-test  $p < 0.05$ ) across the studied groups (Table 2). Two miRNAs (*i.e.*; miR-128 and miR-99b-5p) had increased circulating concentrations both in prediabetic subjects and patients with type 2 diabetes compared to control subjects (Table 2).

All the 9 miRNAs differentially expressed among the discovery groups were analysed by quantitative RT-PCR using the whole cohort of 145 individuals (Fig 1) containing 50% men and 50% women. As shown on Fig 1, altered expressions of miR-128 and miR-423-5p in pre-diabetic patients compared to controls were confirmed with high significance ( $p < 0.05$ ). In addition, miR-374a-5p and miR-130b-3p were altered in the same direction in the whole group of patients suffering from T2DM than in discovery group, compared to the control group of subjects, and miR-130b-3p was only affected in the T2DM group. Altered expressions of miR-629a-5p, let-7d-3p, miR-142-3p and miR-484 were not confirmed in the whole cohort ( $p < 0.05$ ).

Then miRNA expressions were analysed in women and men independently (Fig 2). Altered expressions of miR-128 in pre-diabetic state vs control was found significant in the group of

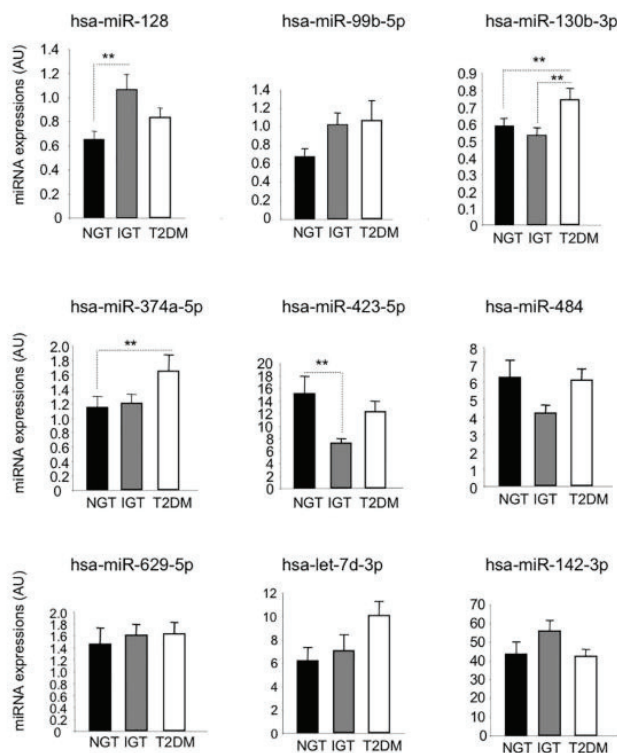
**Table 2. List of differentially expressed circulating miRNAs in the identification group.**

Groups	miRNAs	Fold changes	p value
NGT vs IGT	hsa-miR-128	1.42	0.041
	hsa-miR-99b-5p	1.41	0.028
IGT vs T2DM	hsa-miR-130b-3p	1.41	0.035
	hsa-miR-142-3p	0.57	0.0041
	hsa-miR-374a-5p	0.58	0.039
	hsa-miR-423-5p	1.54	0.011
	hsa-miR-484	1.37	0.004
	hsa-miR-629-5p	1.84	0.030
NGT vs T2DM	hsa-let-7d-3p	1.26	0.029
	hsa-miR-128	1.50	0.047
	hsa-miR-130b-3p	1.46	0.049
	hsa-miR-142-3p	0.65	0.039

Ct values were used to evaluate differences among the identification group and to select candidate miRNAs

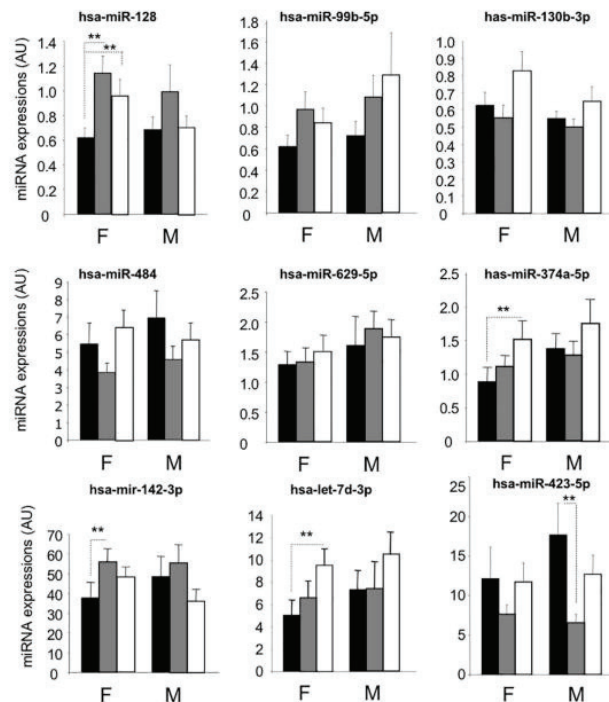
doi:10.1371/journal.pone.0128372.t002

women only. On the contrary, altered expression of miR-423-5p was significantly decreased in the group of men (NGT vs IGT) only. The increase level of miR-374a-5p in the diabetic



**Fig 1. Circulating miRNA concentration of the 9 selected miRNAs, in the whole cohort of 145 individuals. \*\* = p values < 0.05. Data are expressed as arbitrary units (AU).**

doi:10.1371/journal.pone.0128372.g001



**Fig 2. Circulating miRNA concentrations of the 9 selected miRNAs, in the whole cohort of 145 individuals, but considering men (M) and women (F) independently.** \*\* =  $p$  values < 0.05. Data are expressed as arbitrary units (AU). Black, control subjects; Grey, pre-diabetic subjects; White, diabetic patients.

doi:10.1371/journal.pone.0128372.g002

subjects vs controls was found significant in the group of women only. Finally, miR-142-3p which was not differentially expressed considering the whole cohort (Fig 1), was found differentially expressed when the group of women was analysed independently (NGT vs IGT, Fig 2).

### Correlation of miRNAs with Metabolic Parameters

Correlations between the levels of the validated miRNAs with the metabolic parameters were calculated in the whole cohort of subjects (Table 3). They were positively or negatively correlated to cholesterol levels, HbA<sub>1C</sub>, insulin resistance and hyperinsulinemia. MiR-128, which was increased in prediabetic patients (Fig 1), was positively correlated with serum cholesterol. On the contrary, miR-423-5p decreased in the serum of prediabetic patients (Fig 1) was negatively correlated to HDL-cholesterol.

### miRNA Target Genes Analysis

Target genes of the 4 validated miRNAs were predicted and significant cellular pathways affected by these genes were retrieved for each miRNA. Significant KEGG pathways are shown on Fig 3. There are related to cell cycle, signaling pathways, lipid metabolism, glycan biosynthesis, brain functions and immune system.

### Circulatory miRNA levels in HFD mice vs NPD fed mice

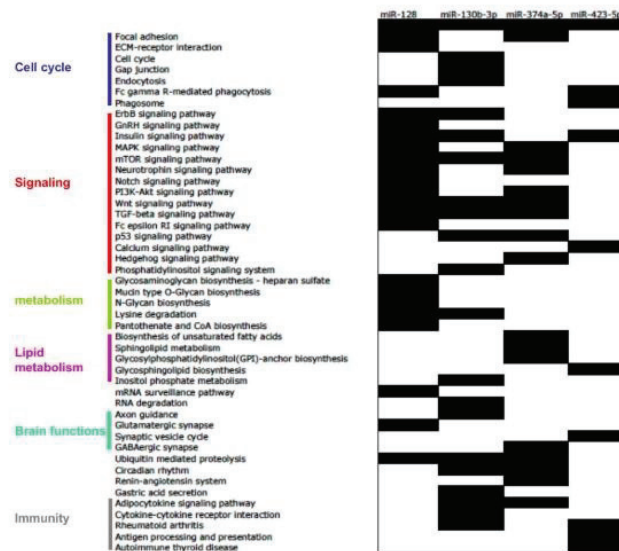
To further corroborate the associations assessed in human, the present study also analyzed by means of qRT-PCR circulating miRNA concentrations in the plasma of diet-induced diabetic mice (HFD). In the context of the well-known insulin-resistance effects, high-fat diet led to

**Table 3. Correlations between circulating miRNA concentrations and metabolic parameters in the study subjects.**

	miRNAs	Metabolic parameters	Estimate	StdErr	tValue	Probt
Correlations not adjusted for sex	miR-128	Serum-cholesterol	0.003482	0.001333	2.61	0.0099
	miR-423-5p	HDL-cholesterol	-0.3067	0.1363	-2.25	0.0260
	miR-130b-3p	HbA1C	0.1902	0.04745	4.01	<.0001
	miR-374a-5p	HbA1C	0.1745	0.07149	2.44	0.0159
	miR-374a-5p	HOMA-IR	0.1093	0.04364	2.50	0.0134
	miR-374a-5p	Fasting-Insulin	0.04148	0.01844	2.25	0.0260
	miR-128	Serum-cholesterol	0.003594	0.001323	2.72	0.0074
	miR-423-5p	HDL-cholesterol	-0.3052	0.1266	-2.41	0.0172
Correlations adjusted for sex	miR-130b-3p	HbA1C	0.1903	0.04728	4.03	<.0001
	miR-374a-5p	HbA1C	0.1763	0.07174	2.46	0.0152
	miR-374a-5p	HOMA-IR	0.1082	0.04383	2.47	0.0147
	miR-374a-5p	Fasting-Insulin	0.04138	0.01852	2.23	0.0270

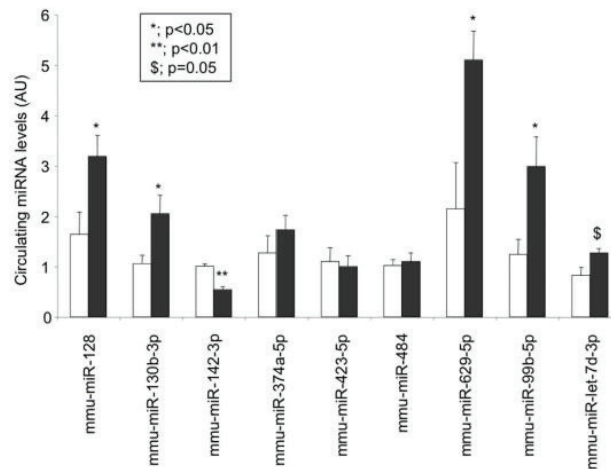
To calculate correlations, Ct values were converted into copy numbers ( $10^{((Ct-25)/-3.3)} * 100$ ) to take into account the logarithmic scale of the data.

doi:10.1371/journal.pone.0128372.t003



**Fig 3. Predicted cellular pathways of the target genes of the significantly altered circulating miRNAs in serum of pre- and/or diabetic patients vs controls.** Only validated miRNAs in the whole cohort were considered.

doi:10.1371/journal.pone.0128372.g003



**Fig 4. Circulating miRNA concentrations of the 9 selected miRNAs identified in the discovery group quantified in the serum of mice fed with normal pellet diet (NPD; n = 5) or with high fat diet (HFD; n = 6).** Data are expressed as arbitrary units (AU). White, NPD mice; Black, HFD.

doi:10.1371/journal.pone.0128372.g004

increased circulating concentrations of miR-128, miR-130b-3p, miR-99b-5p, miR-629a-5p and miR-let-7d-3p expression in HFD mice compared with NPD fed mice ( $p < 0.05$ ). Conversely, miR-142-3p was significantly lower in HFD animals compared to control mice (Fig 4). Correlations between the expressions of altered miRs (HFD vs NPD) with the metabolic parameters were calculated and are shown in Table 4. As in human pre-diabetic subjects, miR-128 was positively correlated with cholesterol.

## Discussion

South Asians are characterized by a unique metabolic profile with higher insulin levels [3], a greater degree of insulin resistance [4], greater abdominal adiposity *i.e.*, higher waist circumference despite lower body mass index [2] and a higher prevalence of diabetes [5]. Insulin resistance has been demonstrated in Asian Indians even during adolescence [6] and hyperinsulinemia seems to be present in Asian Indians even at birth [7]. It appears that some

**Table 4. Correlations between circulating miRNA concentrations and metabolic parameters in mice.**

miRNAs	metabolic parameters	Estimate	StdErr	tValue	Probt
miR-128	cholesterol	-0.0292	0.005164	-5.65	0.0005
miR-484	Glucose	-0.01151	0.00478	-2.41	0.04
miR-629-5p	Glucose	0.04474	0.01286	3.48	0.007
miR-128	Glucose	0.02141	0.00837	2.56	0.031
miR-130b-3p	HbA1c	-1.2578	0.4202	-2.99	0.019
miR-99b-5p	HbA1c	-2.4481	0.463	-5.29	0.001
miR-130b-3p	HDL	-0.03028	0.00876	-3.46	0.011
miR-99b-5p	HOMA_IR	0.1122	0.04224	2.66	0.026
miR-let-7d-3p	HOMA_IR	0.02725	0.01108	2.46	0.036
miR-99b-5p	TGL	0.02065	0.00898	2.3	0.047
miR-let-7d-3p	TGL	0.005752	0.00214	2.69	0.025
miR-99b-5p	VLDL	0.1033	0.04491	2.3	0.047
miR-let-7d-3p	VLDL	0.02876	0.0107	2.69	0.025

doi:10.1371/journal.pone.0128372.t004

of the increased propensity for South Asians to develop insulin resistance could be attributable to greater accumulation of visceral fat [35, 36]. Thus South Asians are at elevated risk for T2DM, compared with Caucasian and other ethnic groups [2]. As a consequence, circulating miRNAs previously identified in caucasian diabetic population [26, 28, 33, 37] might not be relevant for Asian population. Thus, in this study, we have analysed the expression of circulating miRNAs in serum of non obese Indian subjects suffering from T2DM compared with controls or pre-diabetic subjects. Considering the whole population, this analysis revealed 4 differentially expressed miRNAs (miR-128, miR-130b-3p, miR-374a-5p, miR-423-5p) in subjects with prediabetes and T2DM patients compared to control subjects with normal glucose tolerance. Our study also highlighted that some miRNAs (miR-128 and miR-374a, miR-142-3p, let-7d-3p, miR-423-5p) had sex-specific associations with prediabetes or diabetes. For example, the expression of miR-128, which was strongly correlated with the level of cholesterol, was significantly more increased in the serum of pre- and diabetic women and in men. In fact, for the same BMI and waist circumferences, we found that the groups of control-, pre-diabetic and diabetic women enrolled in this study, had significantly more cholesterol than the group of control, pre-diabetic and diabetic men. In addition, the group of diabetic men was significantly younger than the group of diabetic women ( $41.7 \pm 1.45$  vs  $47.08 \pm 1.72$ ;  $p = 0.02$ ) which could explain that some miRNAs differentially expressed between controls and diabetics were not significantly altered in the group of men (*i.e.*; miR-128; miR-374a, miR-142-3p and let-7d-3p). However, whatever the considered miRNAs, their variations among the groups were in the same direction for both men and women (Fig 2).

Among the altered circulating miRNAs identified in this study, miR-128 has never been described in previous studies [26–33, 37]. In our study, circulatory miR-128 level was found increased in prediabetic subjects and was confirmed in diet-induced diabetic mice compared to controls. Interestingly, miR-128 which was positively correlated with cholesterol level in our Indian population and in the diabetic mice, has been shown to post-transcriptionally inhibit the cholesterol transporters and play a regulatory role in cholesterol efflux and cholesterol homeostasis [38]. Moreover, it was demonstrated that miR-128 down-regulated genes involved in insulin signaling (*e.g.*; insulin receptor, insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinases regulatory 1) in muscle cells [39]. Taking into consideration of all these data, we suggested that the increased level of circulating miR-128 might be linked to the development of dyslipidemia associated with T2DM.

Beside its potential predictive value, the profile of circulating miRNAs could also furnish precious information about the pathophysiology of the disease. Although the precise source of blood miRNAs is presently unknown, most of them can be produced by a variety of cells, including all organs whose functions are altered in T2DM (*e.g.*; pancreas, liver, adipose tissue and skeletal muscle). In agreement, the analysis of the biological functions of the target genes for the 4 differentially expressed miRNAs in pre- and or diabetic subjects, revealed their roles in signaling pathways (*e.g.*; insulin and PI3K-AKT signaling pathways), cell proliferation, lipid and glycan metabolism, adipocytokine signaling and immune response. All these functions are altered in the insulin sensitive tissues of prediabetes and T2DM. More interestingly, this analysis also showed that some of the differentially expressed miRNA target genes were predicted to regulate brain functions. Recent studies support the concept that T2DM is associated with cognitive dysfunctions and structural brain changes [40]. Indeed, it is well-admitted that brain plays a key role in normal glucose regulation and in T2DM development and there is evidence for a brain-centered system that can lower blood glucose via insulin and non-insulin dependent mechanisms [41]. Among the 4 differentially expressed miRNAs of this study, miR-128 is a brain enriched miRNA which is highly expressed during neuronal differentiation [42]. It governs neuronal excitability and motor behavior in mice [43]. Interestingly, miR-128 has been



shown to be one of the circulatory miRNA biomarkers for detection of mild cognitive impairment [44]. Recently, GWAS (Genome Wide Association Study) for type 2 diabetes in Indians have identified a new susceptibility locus which harbors the genes that are involved in neurological processes further suggesting a neurological component in the etiology of T2DM [45]. Therefore, alteration of circulating miRNA in T2DM might highlight cognitive dysfunctions associated with metabolic diseases.

To conclude, our study is the first of its kind in India to demonstrate altered levels of serum miRNAs in subjects with IGT and T2DM patients compared to control subjects. Among the altered miRNAs identified in this study, miR-128 has never been described in previous studies/populations and deserves further in-depth investigations. Unlike GWAS which has limited clinical interpretation, circulatory miRNAs might be clinically relevant robust biomarkers. Our findings imply directionality towards biomarker potential of miRNAs in the prevention/diagnosis/treatment outcomes of diabetes.

## Supporting Information

**S1 Fig. Cluster and Tree View softwares (ref) were used for hierarchical clustering of normalized miRNA expressions of the 112 miRNA expressed in all subjects (discovery group).** ref = Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., and Botstein, D. 1998. Cluster Analysis and Display of Genome-Wide Expression Patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95: 14863–14868. (TIFF)

**S1 Table. Metabolic parameters significantly different between men and women in each group (NGT, IGT and T2DM).** p values < 0.05 (\*) are significant, F = female and M = male (XLS)

**S2 Table. Metabolic parameters of mice fed with normal pellet diet (NPD group) or with high fat diet (HFD group) for 6 months.** ND = not determined; in black bold = significant 'p' values (XLS)

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MB. Performed the experiments: PP CS SA BM CSS. Analyzed the data: MB SR VM CG AV PP. Contributed reagents/materials/analysis tools: MB VM SR. Wrote the paper: MB SR VM PP. Participated in the presentation of the manuscript: MB SR VM PP CS SA BM CG AV CSS. Reviewed and approved the final content of the manuscript: MB VM SR PP CS SA BM CG AV CSS.

## References

1. Mohan V, Sandeep S, Deepa R, Shah B, Varghese C. Epidemiology of type 2 diabetes: Indian scenario. *The Indian journal of medical research.* 2007; 125(3):217–30. PMID: [17496352](#)
2. Gujral UP, Pradeepa R, Weber MB, Narayan KM, Mohan V. Type 2 diabetes in South Asians: similarities and differences with white Caucasian and other populations. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2013; 1281:51–63. doi: [10.1111/j.1749-6632.2012.06838.x](#) PMID: [23317344](#)
3. Mohan V, Sharp P, Cloke H, Burrin J, Schumer B, Kohner E. Serum immunoreactive insulin responses to a glucose load in Asian Indian and European type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients and control subjects. *Diabetologia.* 1986; 29(4):235–7. doi: [10.1007/bf00454882](#) PMID: [3519338](#)
4. Sharp P, Mohan V, Levy J, Mather H, Kohner E. Insulin resistance in patients of Asian Indian and European origin with non-insulin dependent diabetes. *Hormone and metabolic research.* 1987; 19(2):84–5. doi: [10.1055/s-2007-1011745](#) PMID: [3549505](#)

5. McKeigue PM, Shah B, Marmot MG. Relation of central obesity and insulin resistance with high diabetes prevalence and cardiovascular risk in South Asians. *Lancet*. 1991; 337(8738):382–6. doi: [10.1016/0140-6736\(91\)91164-p](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91164-p) PMID: 1671422
6. Misra A, Vikram NK, Arya S, Pandey RM, Dhingra V, Chatterjee A, et al. High prevalence of insulin resistance in postpubertal Asian Indian children is associated with adverse truncal body fat patterning, abdominal adiposity and excess body fat. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2004; 28(10):1217–26. doi: [10.1038/sj.ijo.0802704](https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802704)
7. Yajnik C, Lubree H, Rege S, Naik S, Deshpande J, Deshpande S, et al. Adiposity and hyperinsulinemia in Indians are present at birth. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002; 87(12):5575–80. doi: [10.1210/jc.2002-020434](https://doi.org/10.1210/jc.2002-020434) PMID: 12466355
8. Mohan V, Amutha A, Ranjani H, Unnikrishnan R, Datta M, Anjana RM, et al. Associations of  $\beta$ -cell function and insulin resistance with youth-onset type 2 diabetes and prediabetes among Asian Indians. *Diabetes technology & therapeutics*. 2013; 15(4):315–22. doi: [10.1089/dia.2012.0259](https://doi.org/10.1089/dia.2012.0259)
9. Staimez LR, Weber MB, Ranjani H, Ali MK, Echouffo-Tcheugui JB, Phillips LS, et al. Evidence of reduced  $\beta$ -cell function in Asian Indians with mild dysglycemia. *Diabetes care*. 2013; 36(9):2772–8. doi: [10.2337/dc12-2290](https://doi.org/10.2337/dc12-2290) PMID: 23596180
10. Bartel D. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009; 136(2):215–33. doi: [10.1016/j.cell.2009.01.002](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002) PMID: 19167326
11. Granjon A, Gustin M-PP, Rieusset J, Lefai E, Meugnier E, Güller I, et al. The microRNA signature in response to insulin reveals its implication in the transcriptional action of insulin in human skeletal muscle and the role of a sterol regulatory element-binding protein-1c/myocyte enhancer factor 2C pathway. *Diabetes*. 2009; 58(11):2555–64. doi: [10.2337/db09-0165](https://doi.org/10.2337/db09-0165) PMID: 19720801
12. Shantikumar S, Caporali A, Emanuelli C. Role of microRNAs in diabetes and its cardiovascular complications. *Cardiovascular research*. 2012; 93(4):583–93. doi: [10.1093/cvr/cvr300](https://doi.org/10.1093/cvr/cvr300) PMID: 22065734
13. Guay C, Jacovetti C, Nesca V, Motterle A, Tugay K, Regazzi R. Emerging roles of non-coding RNAs in pancreatic  $\beta$ -cell function and dysfunction. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2012; 14 Suppl 3:12–21. doi: [10.1111/j.1463-1326.2012.01654.x](https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2012.01654.x)
14. Jacovetti C, Regazzi R. Compensatory  $\beta$ -cell mass expansion: a big role for a tiny actor. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2013; 12(2):197–8. doi: [10.4161/cc.23378](https://doi.org/10.4161/cc.23378) PMID: 23287464
15. Plaisance V, Waeber G, Regazzi R, Abderrahmani A. Role of microRNAs in islet beta-cell compensation and failure during diabetes. *Journal of diabetes research*. 2014; 2014:618652. doi: [10.1155/2014/618652](https://doi.org/10.1155/2014/618652) PMID: 24734255
16. Regazzi R, Dalle S, Abderrahmani A. Compensatory mechanisms of pancreatic beta cells: insights into the therapeutic perspectives for diabetes. *Journal of diabetes research*. 2014; 2014:217387. doi: [10.1155/2014/217387](https://doi.org/10.1155/2014/217387) PMID: 25133190
17. Mitchell P, Parkin R, Kroh E, Fritz B, Wyman S, Pogosova-Agadjanyan E, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008; 105(30):10513–8. doi: [10.1073/pnas.0804549105](https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105) PMID: 18663219
18. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical chemistry*. 2010; 56(11):1733–41. doi: [10.1373/clinchem.2010.147405](https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405) PMID: 20847327
19. Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang C-YY. Horizontal transfer of microRNAs: molecular mechanisms and clinical applications. *Protein & cell*. 2012; 3(1):28–37. doi: [10.1007/s13238-012-2003-z](https://doi.org/10.1007/s13238-012-2003-z)
20. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic acids research*. 2011; 39(16):7223–33. doi: [10.1093/nar/gkr254](https://doi.org/10.1093/nar/gkr254) PMID: 21609964
21. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology*. 2011; 13(4):423–33. doi: [10.1038/ncb2210](https://doi.org/10.1038/ncb2210) PMID: 21423178
22. Wagner J, Riwanto M, Besler C, Knau A, Fichtlscherer S, Röxe T, et al. Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013; 33(6):1392–400. doi: [10.1161/atvbaha.112.300741](https://doi.org/10.1161/atvbaha.112.300741) PMID: 23559634
23. Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PloS one*. 2008; 3(9). doi: [10.1371/journal.pone.0003148](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003148)
24. Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, et al. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circulation research*. 2010; 106(6):1035–9. doi: [10.1161/circresaha.110.218297](https://doi.org/10.1161/circresaha.110.218297) PMID: 20185794

25. Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009; 106(11):4402–7. doi: [10.1073/pnas.0813371106](https://doi.org/10.1073/pnas.0813371106) PMID: [19246379](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19246379/)
26. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circulation research*. 2010; 107(6):810–7. doi: [10.1161/circresaha.110.226357](https://doi.org/10.1161/circresaha.110.226357) PMID: [20651284](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20651284/)
27. Kong L, Zhu J, Han W, Jiang X, Xu M, Zhao Y, et al. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study. *Acta diabetologica*. 2011; 48(1):61–9. doi: [10.1007/s00592-010-0226-0](https://doi.org/10.1007/s00592-010-0226-0) PMID: [20857148](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20857148/)
28. Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Rovira O, Guerra E, Esteve E, et al. Profiling of circulating microRNAs reveals common microRNAs linked to type 2 diabetes that change with insulin sensitization. *Diabetes care*. 2014; 37(5):1375–83. doi: [10.2337/dc13-1847](https://doi.org/10.2337/dc13-1847) PMID: [24478399](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24478399/)
29. Karolina DS, Armugam A, Tavintharan S, Wong MT, Lim SC, Sum CF, et al. MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus. *PloS one*. 2011; 6(8). doi: [10.1371/journal.pone.0022839](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022839)
30. Karolina DS, Tavintharan S, Armugam A, Sepramaniam S, Pek SL, Wong MT, et al. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012; 97(12):6. doi: [10.1210/jc.2012-1996](https://doi.org/10.1210/jc.2012-1996)
31. Wang Y-cC, Li Y, Wang X-yY, Zhang D, Zhang H, Wu Q, et al. Circulating miR-130b mediates metabolic crosstalk between fat and muscle in overweight/obesity. *Diabetologia*. 2013; 56(10):2275–85. doi: [10.1007/s00125-013-2996-8](https://doi.org/10.1007/s00125-013-2996-8) PMID: [23868745](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23868745/)
32. Rong Y, Bao W, Shan Z, Liu J, Yu X, Xia S, et al. Increased microRNA-146a levels in plasma of patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *PloS one*. 2013; 8(9). doi: [10.1371/journal.pone.0073272](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073272)
33. Pescador N, Pérez-Barba M, Ibarra JM, Corbatón A, Martínez-Larrad MT, Serrano-Ríos M. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type 2 diabetes and obesity biomarkers. *PloS one*. 2013; 8(10). doi: [10.1371/journal.pone.0077251](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077251)
34. Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A, Andreassen D, Mouritzen P, Wrang Teillum M, et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods (San Diego, Calif)*. 2013; 59(1):6. doi: [10.1016/j.ymeth.2012.09.015](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.09.015) PMID: [23036329](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23036329/)
35. Anjana M, Sandeep S, Deepa R, Vimalaswaran KS, Farooq S, Mohan V. Visceral and central abdominal fat and anthropometry in relation to diabetes in Asian Indians. *Diabetes care*. 2004; 27(12):2948–53. PMID: [15562212](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15562212/)
36. Eastwood SV, Tillin T, Dehbi H-MM, Wright A, Forouhi NG, Godsland I, et al. Ethnic differences in associations between fat deposition and incident diabetes and underlying mechanisms: The SABRE study. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2015; 23(3):699–706. doi: [10.1002/oby.20997](https://doi.org/10.1002/oby.20997) PMID: [25645144](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25645144/)
37. Zhu H, Leung SW. Identification of microRNA biomarkers in type 2 diabetes: a meta-analysis of controlled profiling studies. *Diabetologia*. 2015. doi: [10.1007/s00125-015-3510-2](https://doi.org/10.1007/s00125-015-3510-2)
38. Adlakha YK, Saini N. miR-128 exerts pro-apoptotic effect in a p53 transcription-dependent and-independent manner via PUMA-Bak axis. *Cell death & disease*. 2013; 4. doi: [10.1038/cddis.2013.46](https://doi.org/10.1038/cddis.2013.46)
39. Motohashi N, Alexander MS, Shimizu-Motohashi Y, Myers JA, Kawahara G, Kunkel LM. Regulation of IRS1/Akt insulin signaling by microRNA-128a during myogenesis. *Journal of cell science*. 2013; 126(Pt 12):2678–91. doi: [10.1242/jcs.119966](https://doi.org/10.1242/jcs.119966) PMID: [23606743](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23606743/)
40. Biessels GJ, Reijmer YD. Brain changes underlying cognitive dysfunction in diabetes: what can we learn from MRI? *Diabetes*. 2014; 63(7):2244–52. doi: [10.2337/db14-0348](https://doi.org/10.2337/db14-0348) PMID: [24931032](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24931032/)
41. Schwartz MW, Seeley RJ, Tschöp MH, Woods SC, Morton GJ, Myers MG, et al. Cooperation between brain and islet in glucose homeostasis and diabetes. *Nature*. 2013; 503(7474):59–66. doi: [10.1038/nature12709](https://doi.org/10.1038/nature12709) PMID: [24201279](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24201279/)
42. Lin Q, Wei W, Coelho CM, Li X, Baker-Andresen D, Dudley K, et al. The brain-specific microRNA miR-128b regulates the formation of fear-extinction memory. *Nature neuroscience*. 2011; 14(9):1115–7. doi: [10.1038/nn.2891](https://doi.org/10.1038/nn.2891) PMID: [21841775](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21841775/)
43. Tan CL, Plotkin JL, Venø MT, von Schimmelmann M, Feinberg P, Mann S, et al. MicroRNA-128 governs neuronal excitability and motor behavior in mice. *Science (New York, NY)*. 2013; 342(6163):1254–8. doi: [10.1126/science.1244193](https://doi.org/10.1126/science.1244193)
44. Sheinerman KS, Tsivinsky VG, Abdullah L, Crawford F, Umansky SR. Plasma microRNA biomarkers for detection of mild cognitive impairment: biomarker validation study. *Aging*. 2013; 5(12):925–38. PMID: [24368295](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24368295/)
45. Tabassum R, Chauhan G, Dwivedi OP, Mahajan A, Jaiswal A, Kaur I, et al. Genome-wide association study for type 2 diabetes in Indians identifies a new susceptibility locus at 2q21. *Diabetes*. 2013; 62(3):977–86. doi: [10.2337/db12-0406](https://doi.org/10.2337/db12-0406) PMID: [23209189](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23209189/)