



**HAL**  
open science

# Le fer et le microbiote intestinal: deux nouvelles cibles pour améliorer les capacités fonctionnelles et musculaires en condition d'hypoactivité

Kevin Nay

## ► To cite this version:

Kevin Nay. Le fer et le microbiote intestinal: deux nouvelles cibles pour améliorer les capacités fonctionnelles et musculaires en condition d'hypoactivité. Education. Université Rennes 2, 2019. Français. NNT: 2019REN20035 . tel-02569434

**HAL Id: tel-02569434**

**<https://theses.hal.science/tel-02569434>**

Submitted on 11 May 2020

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

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

# THESE DE DOCTORAT DE

**L'UNIVERSITE RENNES 2**

DELIVREE CONJOINTEMENT AVEC

**L'UNIVERSITE DE RENNES 1**

**COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE**

ECOLE DOCTORALE N° 605 - *Biologie Santé*

Spécialité : STAPS

Par

**Kévin NAY**

**Le Fer et le Microbiote Intestinal : Deux Nouvelles Cibles pour Améliorer les Capacités Fonctionnelles et Musculaires en Condition d'Hypoactivité**

Thèse présentée et soutenue à Rennes le 18 octobre 2019

Unité de recherche : *Laboratoire Mouvement, Sport, Santé - EA7470*

*UMR 866 Dynamique Musculaire et Métabolisme*

## Rapporteurs avant soutenance :

Nathalie Boisseau  
Damien Freyssenet

Professeure des universités – Université Clermont Auvergne  
Professeur des universités – Université Jean Monnet

## Composition du Jury :

### Examineurs :

Audrey BERGOUIGNAN  
Pascal GUGGENBUHL  
Olivier LOREAL

Chargée de recherche CNRS – Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien  
Professeur des universités – Praticien hospitalier – CHU Rennes  
Directeur de recherche INSERM – Institut NuMeCan

### Dir. de thèse :

Christelle KOEHLIN-RAMONATXO

Maitre de conférences HDR – Université de Montpellier/INRA

### Co-dir. de thèse :

Frédéric DERBRE

Maitre de conférences – Université Rennes 2



## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier **Nathalie Boisseau** et **Damien Freyssenet** d'avoir accepté d'évaluer ce manuscrit et d'être les rapporteurs de cette thèse. Mes remerciements vont également à **Audrey Bergouignan**, **Pascal Guggenbuhl** et **Olivier Loréal** pour avoir accepté d'examiner ce travail et d'intégrer ce jury de thèse.

Je remercie l'**université de Rennes**, la **région Bretagne**, l'**Institut National de Recherche Agronomique (INRA)**, l'**unité Nutrition Métabolisme Cancer (NuMeCan)**, le **Centre National d'Etudes Spatiales (CNES)**, l'**Agence Spatiale Européenne (ESA)** et l'**Institut de Médecine et de Physiologie Spatiale (MEDES)** pour leurs soutiens scientifique, financier, logistique, matériel et humain.

Merci également au **Laboratoire Mouvement Sport Santé (M2S)** et à l'**Unité Mixte de Recherche – Dynamique Musculaire et Métabolisme (UMR-DMEM)** ainsi qu'à leur directeur respectif, **Benoit Bideau** et **Anne Bonnieu**. Merci aux **membres de ces laboratoires** pour leur accueil, leur gentillesse et leur aide tout au long de ce travail de thèse.

Enfin, je tiens à remercier particulièrement **Christelle Koechlin-Ramonatxo** et **Frédéric Derbré** d'avoir accepté d'être mes directeurs de thèse. Merci pour votre confiance, pour votre bienveillance et pour la qualité de votre encadrement.

# TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	1
TABLE DES MATIERES.....	2
LISTE DES ABREVIATIONS .....	4
LISTE DES TABLEAUX, ILLUSTRATIONS ET FIGURES .....	5
AVANT-PROPOS .....	7
REVUE DE LITTERATURE .....	9
<b>I. L'hypoactivité affecte les capacités fonctionnelles et musculaires .....</b>	<b>11</b>
A. Modèles expérimentaux .....	11
B. L'hypoactivité altère les performances physiques.....	15
C. L'hypoactivité induit des altérations physiologiques et organiques.....	20
<b>II. Le métabolisme du fer : un acteur clé dans les altérations physiologiques associées à l'hypoactivité ?.....</b>	<b>38</b>
A. Homéostasie du fer.....	38
B. L'hepcidine : le chef d'orchestre du métabolisme du fer.....	42
C. Hypoactivité et métabolisme du fer .....	48
<b>III. Le microbiote intestinal : un acteur clé dans les altérations physiologiques associées à l'hypoactivité ?... </b>	<b>57</b>
A. Le microbiote intestinal : une population invisible, anaérobie et hautement diversifiée.....	57
B. Microbiote intestinal et muscle squelettique : un nouveau dialogue et les mécanismes envisagés .....	66
OBJECTIFS DE THESE .....	75
LISTES DES PUBLICATIONS.....	77
<b>I. Articles publiés dans des revues avec comité de lecture .....</b>	<b>77</b>
<b>II. Articles soumis dans des revues avec comité de lecture.....</b>	<b>77</b>
<b>III. Présentations orales lors de congrès nationaux et internationaux .....</b>	<b>78</b>

<b>ETUDES-CONTRIBUTIONS PERSONNELLES .....</b>	<b>79</b>
<b>I. Etude n°1 : L'hypoactivité diminue la biodisponibilité du fer chez le rat : rôle de l'inflammation dans la surexpression d'hepcidine.....</b>	<b>80</b>
<b>II. Etude N°2 : Le reconditionnement intermittent prévient l'atrophie musculaire induite par l'hypoactivité mais ne prévient pas la réduction de la biodisponibilité en fer .....</b>	<b>91</b>
<b>III. Etude N°3: Les bactéries intestinales sont essentielles à la fonction musculaire : un lien potentiel avec l'homéostasie glucidique.....</b>	<b>115</b>
<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>133</b>
<b>I. L'hepcidine joue un rôle clé dans la redistribution du fer en réponse à l'hypoactivité.....</b>	<b>134</b>
A. Le fer est redistribué vers la rate dans les premiers jours d'exposition à l'hypoactivité.....	134
B. L'hepcidine, une hormone clé.....	135
C. Quel rôle joue le muscle squelettique dans les altérations du métabolisme du fer en situation d'hypoactivité ? .....	136
<b>II. Le microbiote intestinal joue un rôle essentiel sur la fonction musculaire: implication du métabolisme du glucose et perspectives de recherche en situation d'hypoactivité .....</b>	<b>139</b>
A. Microbiote et Muscle squelettique : un lien fonctionnel et des premiers éléments de compréhension des mécanismes sous-jacents.....	139
B. Impact de l'hypoactivité sur le microbiote intestinal et problématiques méthodologiques.....	142
<b>III. Le métabolisme du fer et le microbiote intestinal interagissent-ils ?.....</b>	<b>145</b>
A. Le microbiote intestinal module l'absorption du fer dans le tractus intestinal .....	145
B. Le fer module le microbiote intestinal et son activité .....	146
<b>IV. Perspectives de recherche chez l'homme.....</b>	<b>146</b>
A. Protocoles expérimentaux en cours .....	146
B. Recommandations pour améliorer la santé des patients et les capacités fonctionnelles des astronautes : réflexions sur des contre-mesures ou thérapies innovantes.....	148
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>153</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>187</b>
<b>I. Fiches méthodologiques.....</b>	<b>187</b>
<b>II. Curriculum Vitæ (anglais) .....</b>	<b>201</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>4EBP1</b>	Facteur Eucaryotique d'Initiation De La Translation 4E	<b>GIP</b>	Peptide Insulinotrope Dépendant Du Glucose	<b>NF-κB</b>	Nuclear Factor - Kappa B
<b>AACR</b>	Acides Aminés à Chaînes ramifiées	<b>GLP-1</b>	Glucagon Like Peptide 1	<b>NTBI</b>	Fer Non-Lié à La Transferrine
<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique	<b>GLUT2</b>	Transporteur De Glucose 2	<b>O<sub>2</sub></b>	Oxygène
<b>AGCC</b>	Acides Gras à Chaîne Courte	<b>GLUT4</b>	Transporteur de Glucose 4	<b>V̇O<sub>2max</sub></b>	Consommation Maximale D'oxygène
<b>AKT</b>	Protéine Kinase B	<b>GLUT5</b>	Transporteur De Glucose 5	<b>p62</b>	Ubiquitin-Binding Protein P62
<b>AMPK</b>	AMP-Activated Protein Kinase	<b>GPR 41/43</b>	Récepteur Couplé à La G Protéine 41/43	<b>PcoA</b>	Analyses En Coordonnées Principales
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique	<b>HAMP</b>	Gène Codant L'hepcidine	<b>PGC-1α</b>	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha
<b>ATIH</b>	Agence Technique De l'Information Sur l'Hospitalisation	<b>HCO</b>	Hospitalisation Complète	<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-Kinase
<b>ATP</b>	Adénosine Triphosphate	<b>HFD</b>	Régime hypercalorique	<b>PIAS</b>	Protein Inhibitor Of Activated STAT
<b>BMP6</b>	Bone Morphogenetic Protein 6	<b>HFE</b>	Gène De L'hémochromatose	<b>PKC</b>	Protéine Kinase C
<b>BMP<sub>r</sub></b>	BMP Receptor	<b>HJV</b>	Hémojuvéline	<b>PYY</b>	Peptide YY
<b>BMP-RE</b>	BMP Response Element	<b>HMOX</b>	Hème Oxygénase	<b>S6K1</b>	S6 Kinase 1
<b>BR</b>	Bedrest / alitement	<b>HU</b>	Suspension Par La Queue	<b>SGLT1</b>	Co-Transporteur Sodium-Glucose 1
<b>CD14</b>	Cluster De Differentiation 14	<b>IGF-1</b>	Insuline like growth factor 1	<b>SMCT</b>	Sodium Dépendant Monocarboxylate Transporters
<b>CNES</b>	Centre National d'Etudes Spatiales	<b>IKI</b>	Agence Spatiale Russe	<b>SOCS</b>	Suppressors Of Cytokine Signaling
<b>CSA</b>	Aire De Section transverse D'une Fibre Musculaire	<b>IL-10</b>	Interleukine-10	<b>STAT3</b>	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
<b>DI</b>	Immersion Sèche	<b>IL-1β</b>	Interleukine-1β	<b>STEAP</b>	Six-Transmembrane Epithelial Antigen Of Prostate
<b>DMT1</b>	Divalent Metal-Ion Transporter 1	<b>IL-6</b>	Interleukine-6	<b>Tf</b>	Transferrine
<b>EDL</b>	long extenseur des orteils	<b>IL-6R</b>	Récepteur à L'interleukine-6	<b>TfR1/2</b>	Récepteur à La Transferrine 1/2
<b>EPO</b>	Erythropoïétine	<b>IRM</b>	Imagerie par résonance Magnétique	<b>TGF-β</b>	Facteur De Croissance Transformant-B
<b>ERDO</b>	Espèces Réactives Dérivées De L'oxygène	<b>IRS-1</b>	Récepteur Sensible à L'insuline 1	<b>TIBC</b>	Capacité Totale De Fixation Du Fer
<b>ERFE</b>	Erythroferrone	<b>ISS</b>	Station Spatiale Internationale	<b>TLR-4</b>	Recepteur Toll Like -4
<b>ERK1/2</b>	Extracellular Signal-Regulated Kinase	<b>JAK</b>	Janus Kinase	<b>TMPRSS6</b>	Transmembrane Serine Protease 6
<b>ESA</b>	Agence Spatiale Européenne	<b>KDa</b>	Kilodalton	<b>TNF-α</b>	Facteur De Nécrose Tumorale α
<b>FAM132b</b>	Gène De L'erythroferrone	<b>LC3</b>	Microtubule-Associated Protein 1A/1B-Light Chain 3	<b>TSC1</b>	Hamartine
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	Fer Ferreux	<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide	<b>TSC2</b>	Tubérine
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	Fer Ferrique	<b>MAFbx</b>	Muscle Atrophy F-Box	<b>TWSG1</b>	Modulateur De Signalisation Des BMP A Gastrulation Torsadée
<b>FIAF</b>	Fasting-Induced Adipocyte Factor	<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinases	<b>Ub</b>	Ubiquitine
<b>FNLT</b>	Fer Non-Lié à La Transferrine	<b>MCT</b>	Monocarboxylate Transporters	<b>ULLS</b>	Suspension Unilatérale D'une Jambe
<b>FoxO3</b>	Forkhead Box Proteins De Classe O-3	<b>MEDES</b>	Institut De Médecine Et De Physiologie Spatiales	<b>VMA</b>	Vitesse Maximale Aérobie
<b>FPN</b>	Ferroportine	<b>MHC</b>	Chaînes Lourdes De Myosine	<b>VMC</b>	Contraction Maximale Volontaire
<b>GAS</b>	Interféron γ-Activation Sequence	<b>mTOR</b>	Cible Fonctionnelle De La Rapamycine	<b>ZnT</b>	Transporteur Du Zinc
<b>GDF-15</b>	Facteur De Différenciation De Croissance 15	<b>MuRF1</b>	Muscle Ring Finger Protein-1	<b>ZO-1</b>	Zonuline 1
<b>GF</b>	Souris Axéniques	<b>NASA</b>	Agence Spatiale Américaine		

# LISTE DES TABLEAUX, ILLUSTRATIONS ET FIGURES

## **Table des tableaux :**

Tableau n°1: Les principaux modèles expérimentaux d'hypoactivité.....	14
Tableau n°2 : Les principaux paramètres de performance fonctionnelle .....	18
Tableau n°3 : Atrophie musculaire en réponse à l'hypoactivité .....	25
Tableau n°4 : Principaux indicateurs du bilan martial.....	49
Tableau n°5 : Impact de l'hypoactivité sur le métabolisme du fer et le transport de l'oxygène .....	53
Tableau n°6 : Impact de l'activité physique sur le microbiote intestinal .....	63

## **Table des illustrations**

Illustration n°1 : Impact de l'hypoactivité sur la Force musculaire .....	19
Illustration n°2 : Principales altérations physiologiques et organiques de l'hypoactivité .....	22
Illustration n°3 : Voie de signalisation principale régulant la protéosynthèse .....	27
Illustration n°4 : Principaux processus de protéolyse .....	29
Illustration n°5 : Le fonctionnement général du métabolisme du fer.....	40
Illustration n°6 : L'hepcidine : chef d'orchestre du métabolisme du fer.....	44
Illustration n°7 : Mécanismes stimulant la transcription d'hepcidine .....	46
Illustration n°8 : Anatomie de l'intestin et grandes familles bactériennes du microbiote intestinal ...	59
Illustration n°9 : Proposition de mécanismes moléculaires de l'axe microbiote intestinal-muscle squelettique .....	73
Illustration n°10 : Proposition de mécanisme impliquant le muscle squelettique dans les dérégulations du métabolisme du fer à court terme en situation d'hypoactivité .....	138
Illustration n°11 : Proposition de mécanisme liant microbiote intestinal et endurance musculaire .	144

## **Table des Figures**

Figure n°1 : Impact de 5 jours d'immersion sèche sur la biodisponibilité du fer chez l'Homme.....	147
---	-----



# **AVANT-PROPOS**

Le 20 et 21 juillet 2019, déjà 50 ans que l'Homme a foulé pour la première fois la surface de la Lune dans le cadre de la mission Apollo 11. A l'occasion de cet anniversaire, l'administrateur de la NASA, Jim Bridenstine, en a profité pour faire le point sur les programmes habités à destination de la Lune et de Mars. Avec le soutien du président américain, la mission Artemis vise un retour sur la Lune en 2024, et l'année 2033 constituera l'objectif de la NASA pour envoyer des hommes sur Mars. Fin juin 2019 en France, l'Agence Technique de l'Information sur l'Hospitalisation (ATIH) publie parallèlement son rapport pour l'année 2018 (ATIH, 2019). Durant cette année, dans les hôpitaux français, 7,2 millions de patients ont été pris en charge dans le cadre d'hospitalisation complète, c'est-à-dire en séjour "classique" à temps complet durant lequel le patient reste la plupart du temps allongé jusqu'à son rétablissement. En 2018, ces séjours ont duré en moyenne 5,5 jours. Mais quel est le point commun, me diriez-vous, entre la conquête spatiale et les séjours à l'hôpital ?

La réponse est l'hypoactivité. Que ce soit l'astronaute en impesanteur ou le patient immobilisé dans un lit, ces deux personnes sont confrontées à une réduction drastique des contraintes mécaniques imposées à leur appareil musculo-squelettique. De plus, l'impesanteur et la position allongée bouleversent l'équilibre et la répartition des fluides organiques. Tous ces facteurs altèrent les capacités fonctionnelles de l'individu, retardant la rémission du patient ou limitant l'astronaute dans ses missions opérationnelles. La mise au point de divers modèles expérimentaux mimant l'hypoactivité chez l'homme et chez l'animal permettent aujourd'hui d'établir une analyse fine des diverses conséquences, notamment au niveau du muscle squelettique et du transport de l'oxygène, facteurs déterminants pour la performance aérobie. Les mécanismes sous-jacents de ces troubles sont très étudiés par la communauté scientifique afin de développer des contre-mesures adaptées et efficaces dans le but de les prévenir. Parmi les mécanismes existants, l'exploration du métabolisme du fer et du microbiote intestinal apparaissent comme des pistes innovantes autour de cette problématique, d'autant que chacun présente des interactions potentielles avec le muscle squelettique.

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes donc intéressés aux effets de l'hypoactivité sur le métabolisme du fer et le microbiote intestinal afin d'en étudier les mécanismes sous-jacents. Nous avons également porté une attention particulière sur les dialogues inter-organes impliquant le **muscle squelettique**, le **foie** pour sa régulation du métabolisme du fer et le **microbiote intestinal**.

## **REVUE DE LITTÉRATURE**

L'hypoactivité se caractérise par une activité musculaire extrêmement faible au niveau d'un seul membre ou de l'ensemble du corps (Pierre et al., 2016). En raison des progrès des soins médicaux et du vieillissement global de la population, de plus en plus de personnes se retrouvent alitées à l'hôpital ou à leur domicile. En effet, aux Etats-Unis, l'augmentation de l'hospitalisation de personnes âgées est estimée à 11.8% entre 2005 et 2015 (Strunk et al., 2006). Parmi les causes d'hospitalisations avec alitement chez la personne âgée, on retrouve tout particulièrement la fracture de hanche avec 300 000 nouveaux cas par an aux Etats-Unis (Jennings et al., 2010). L'un des principaux troubles associés à l'alitement est le développement rapide d'une atrophie musculaire (Borina et al., 2010). Cette atrophie est souvent un facteur aggravant pour le patient car elle s'accompagne d'une perte de force ainsi que d'un déficit fonctionnel. Ces conséquences délétères exacerbent le mauvais état de santé du patient en induisant des complications et en augmentant la durée d'hospitalisation, ce phénomène concernant tout particulièrement les personnes âgées (Covinsky et al., 2003). Par conséquent, la prévention de la perte de masse musculaire en condition d'immobilisation constitue un enjeu majeur pour les communautés scientifique et médicale.

De plus, les études sur l'hypoactivité vont de pair avec les avancées dans le domaine de la recherche spatiale, la préparation des astronautes aux vols spatiaux prolongés constituant un défi majeur pour les années à venir. En effet, le prochain objectif des agences spatiales vise l'exploration de Mars et exigerait selon les différentes estimations au moins 200 jours de voyage rien que pour s'y rendre. Dans ce contexte, les astronautes devront présenter à leur arrivée sur la planète rouge un « bon état physique et psychologique » afin de réaliser leurs différentes missions en totale autonomie dans un nouvel environnement. Or, l'hypoactivité est associée à de nombreuses conséquences néfastes pour l'astronaute. En impesanteur, les contraintes mécaniques imposées à l'astronaute sont réduite induisant des dysfonctions structurelles, métaboliques et fonctionnelles (Pietsch et al., 2011). L'étude des mécanismes inhérents à ces troubles ainsi que la recherche de contre-mesures les limitant représentent ainsi des objectifs prioritaires pour les agences spatiales.

# I. L'hypoactivité affecte les capacités fonctionnelles et musculaires

## A. Modèles expérimentaux

La compréhension des mécanismes physiopathologiques associés à l'hypoactivité nécessite la mise au point et l'utilisation de modèles expérimentaux répondant aux critères scientifiques de validité, reproductibilité et pertinence. S'il n'existe pas de modèle idéal et universel, de nombreux modèles sont utilisés par la communauté scientifique avec chacun leurs avantages et leurs limites. Les modèles existants sont synthétisés dans le Tableau 1, et nous en détaillerons certains dans ce chapitre.

### 1) Chez l'Homme : du vol spatial à l'alitement jusqu'à l'immersion sèche

#### a) Vols Spatiaux

Les programmes spatiaux menés depuis le début des années 60 par les agences spatiales américaine (NASA) et russe (IKI) ont permis d'évaluer les effets de l'impesanteur sur l'organisme. Ces recherches se sont tout particulièrement intensifiées grâce aux collaborations entre les agences et la mise en place de la Station Spatiale Internationale (ISS) au début des années 2000. Dans cette station survolant la planète à 400 km d'altitude, de nombreuses expériences ont ainsi permis de mieux caractériser les adaptations musculaires, osseuses, hématologiques, cardiaques ou vasculaires associées à l'impesanteur (Fitts et al., 2000a; Trappe et al., 2009). En évaluant directement les modifications physiologiques dans l'espace, ces études sont évidemment les plus pertinentes pour répondre aux enjeux de la conquête spatiale, mais pas forcément pour étudier les effets de l'hypoactivité en elle-même. En effet, tous les astronautes sont soumis à des contre-mesures différenciées et toujours plus nombreuses pour chaque vol. Ces personnes sont par ailleurs exposées dans l'ISS aux radiations cosmiques et à l'hyperoxie constituant des facteurs confondants lorsque la question scientifique vise à évaluer spécifiquement les effets de l'impesanteur et de l'hypoactivité. Enfin, la grande variabilité de réponses individuelles en impesanteur et le faible échantillonnage constituent également de réelles limites dans l'interprétation des résultats comparativement aux modèles expérimentaux utilisés sur Terre chez l'homme et l'animal (Fitts et al., 2000a; Trappe et al., 2009). L'ensemble de ces limites, auxquelles nous pouvons ajouter le coût matériel, humain, logistique et évidemment financier, a donc conduit les

agences spatiales à développer un certain nombre de modèles expérimentaux sur Terre plus accessibles. L'alitement, l'immersion sèche et l'immobilisation d'un membre (i.e. plâtrage, ULLS) constituent ainsi des modèles permettant de mimer de manière standardisée les effets spécifiques de l'impesanteur sur le corps entier ou uniquement sur un groupe musculaire, avec un coût économique bien moindre (cf. Tableau n°1)

b) L'alitement

L'alitement prolongé (en anglais *bedrest*) constitue historiquement le modèle de référence pour explorer chez l'homme les effets de l'impesanteur et de l'hypoactivité. Ces études se caractérisent par l'alitement de volontaires sains sur une période pouvant aller de quelques jours à plusieurs semaines, et entraînent une réduction considérable de l'activité des différents groupes musculaires (tout particulièrement posturaux) dans des proportions proches de ce qui est observé chez l'astronaute (Pavy-Le Traon et al., 2007). Afin de mimer la redistribution du flux sanguin vers la partie supérieure du corps caractéristique de l'impesanteur, les volontaires sont allongés et inclinés avec un angle de 6° produisant un reflux sanguin vers la tête (Pavy-Le Traon et al., 2007). Ce modèle d'alitement nommé en anglais "Head-down bedrest" serait en effet plus représentatif que l'alitement horizontal classique pour reproduire la redistribution des volumes corporels s'opérant en impesanteur (Montgomery, 1993). Ce type d'études est aujourd'hui beaucoup utilisé en raison de leur relative accessibilité. De plus, les résultats issus de ces expériences présentent l'avantage d'évaluer concrètement les effets de l'alitement lors de périodes d'hospitalisations conférant au bedrest un double intérêt aussi bien pour la recherche médicale que pour la recherche spatiale (Adams et al., 2003).

c) Immersion sèche

Au début des années 70 en Russie, un nouveau modèle a été proposé : l'immersion sèche (en anglais *dry immersion*). Ce modèle consiste à immerger un individu dans de l'eau thermiquement neutre et recouverte d'une bâche élastique et étanche. Le sujet repose donc allongé librement dans l'eau tout en restant sec, justifiant ainsi le terme d'immersion sèche (Shul'zhenko et al., 1983). Les propriétés élastiques du tissu permettent de mimer les effets de l'impesanteur via la flottaison et de reproduire les trois grandes altérations physiologiques associées à l'impesanteur, à savoir l'hypoactivité musculaire, l'absence de soutien et d'appuis et une redistribution du volume sanguin vers le haut du corps (Tomilovskaya et al., 2019).

Contrairement au bedrest, ce modèle limite totalement la possibilité pour le sujet de se reposer sur des supports et de disposer d'appuis solides. Des études récentes portant sur des modifications cardiovasculaires, posturales et neuromusculaires et comparant les effets de 21 jours de bedrest et de 3 jours d'immersion sèche révèlent des effets semblables dans leur amplitude, suggérant que l'immersion sèche induit des altérations beaucoup plus rapidement (Tomilovskaya et al., 2019). Ceci permet d'être au plus proche des modalités d'inactivité musculaire rencontrées en situation réelle dans l'espace par rapport au modèle d'alitement classique (Navasiolava et al., 2011). Ce modèle permet ainsi de réduire le temps des études cliniques, et donc mécaniquement les coûts humains et financiers associés. Néanmoins, la conception de baignoires spécifiques utilisées pour ces études est coûteuse. Par conséquent, seules les agences spatiales russes et françaises (CNES) utilisent actuellement ce modèle, le CNES conduisant ses expérimentations au sein de l'Institut de Médecine et de Physiologie Spatiales (MEDES) à Toulouse.

## 2) Chez l'animal : la suspension par la queue, le modèle de référence

Le modèle le plus communément utilisé pour explorer les effets de l'hypoactivité chez le rongeur est la suspension du rat ou de la souris par la queue. Ce modèle développé par la NASA au début des années 80, notamment par Ruth Globus et Emily Morey-Holton, est toujours considéré comme le modèle de référence pour étudier les effets biologiques de l'impesanteur chez le rongeur. Grâce à un système de harnais, le rongeur peut se déplacer dans sa cage mais ne peut plus utiliser les muscles de ses membres inférieurs induisant une hypoactivité drastique au niveau des muscles posturaux. Un nombre considérable de travaux ont ainsi été publiés sur les effets de l'hypoactivité sur le système musculosquelettique (Morey-Holton and Globus, 2002). Dans ce modèle, l'animal est suspendu avec un angle d'environ 30° permettant de générer une redistribution du flux sanguin vers la partie antérieure du corps de l'animal, et mimant ainsi les effets observés en situation d'impesanteur. Ce modèle est également très utilisé pour étudier les effets de l'hypoactivité sur les fonctions cardiovasculaires et la modification des flux liquidiens dans l'organisme. Plus récemment, de nouveaux travaux élargissent les champs d'exploration en s'intéressant aux effets de l'hypoactivité sur d'autres organes comme le cerveau, la rate ou le foie (Morey-Holton et al., 2005).

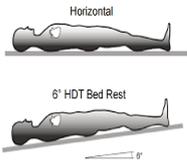
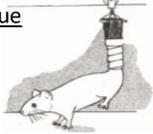
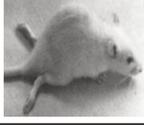
Tableau n°1 : Description des principaux modèles d'hypoactivité chez l'homme et le rongeur				
Chez l'Homme	Cible	Avantages	Limites	Références
<p><u>Vol spatial</u></p> 	Corps entier	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Etude de référence pour l'impesanteur</li> <li>- Réalité de l'environnement spatial</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coût économique</li> <li>- Echantillonnage faible</li> <li>- Contre-mesures en parallèle</li> </ul>	Edgerton <i>et al.</i> , 1995; LeBlanc <i>et al.</i> , 1995; Zange <i>et al.</i> , 1997; Widrick <i>et al.</i> , 1999
<p><u>Alitement (bedrest)</u></p> 	Corps entier	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Etude de référence pour les personnes alitées</li> <li>- Facilité et économique</li> <li>- Inclinaison mime la redistribution sanguine en impesanteur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Présence d'appuis</li> <li>- Durée longue</li> </ul>	Convertino <i>et al.</i> 1989; LeBlanc <i>et al.</i> , 1992; Berry <i>et al.</i> , 1993; Tabata <i>et al.</i> , 1999; Kawakami <i>et al.</i> , 2000, Kawakami <i>et al.</i> 2001; Akima <i>et al.</i> , 2001; Ferretti <i>et al.</i> , 2001; Alkner <i>et al.</i> 2004
<p><u>Immersion sèche</u></p> 	Corps entier	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aucun appui</li> <li>- Modèle proche de l'impesanteur</li> <li>- Rapidité des effets observés</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Induction de douleurs dorsales</li> <li>- Modèle encore peu utilisé donc peu de données</li> </ul>	Navasiolava <i>et al.</i> , 2011; Demangel <i>et al.</i> , 2017; Tomilovskaya <i>et al.</i> , 2019
<p><u>ULLS</u></p> 	Jambe unilatérale	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Facilité, Economique</li> <li>- Comparaison controlatérale intra-sujet</li> <li>- Proche des conditions avec un membre immobilisé (plâtrage)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activité musculaire maintenue sur autres membres</li> </ul>	Hather <i>et al.</i> , 1992; Adams <i>et al.</i> 1994; Ploutz-Snyder <i>et al.</i> , 1995; Schulze <i>et al.</i> 2002; Clark <i>et al.</i> 2006; Cook <i>et al.</i> , 2010
Chez l'Animal	Cible	Avantages	Limites	Références
<p><u>Vol spatial</u></p> 	Corps entier	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Etude de référence pour l'impesanteur</li> <li>- Réalité de l'environnement spatial</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Transposition de l'animal à l'humain</li> <li>- Echantillonnage faible</li> </ul>	Henriksen <i>et al.</i> , 1993; Caiozzo <i>et al.</i> , 1994; Sandonà <i>et al.</i> , 2012
<p><u>Suspension par la queue</u></p> 	Corps entier sauf membres supérieurs	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Facilité</li> <li>- Inclinaison mime la redistribution sanguine en impesanteur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Transposition de l'animal à l'humain</li> <li>- Appuis des pattes antérieures</li> </ul>	Thomason <i>et al.</i> 1987; D'Aunno <i>et al.</i> , 1990; 1992; Bangart <i>et al.</i> , 1997; Cros <i>et al.</i> , 1999; Miyazaki <i>et al.</i> , 2008; Derbre <i>et al.</i> , 2012
<p><u>Dénervation</u></p> 	Patte unilatérale	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Très (trop) grande efficacité</li> <li>- Analyse controlatérale intra-sujet</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Transposition de l'animal à l'humain</li> <li>- Modèle trop drastique</li> </ul>	Yoshimura <i>et al.</i> , 2002; Nicolino <i>et al.</i> , 2009; Bongers <i>et al.</i> , 2013; Wu <i>et al.</i> , 2014; Liu <i>et al.</i> , 2019
<p><u>Blocage d'une patte</u></p> 	Patte unilatérale	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Référence pour un membre immobilisé</li> <li>- Analyse controlatérale intra-sujet</li> <li>- Moins drastique que la dénervation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Transposition modèle animal à l'humain.</li> <li>- Appuis des pattes avant</li> </ul>	Caron <i>et al.</i> , 2009; Chacon-Cabrera <i>et al.</i> , 2017; Lang <i>et al.</i> , 2012; Lin <i>et al.</i> , 2016

Tableau n°1: Les principaux modèles expérimentaux d'hypoactivité

En conclusion, chez l'Homme et l'animal, l'alitement et la suspension par la queue sont les modèles les plus utilisés mais l'immersion sèche lorsqu'elle est accessible apparaît particulièrement pertinente. Contrairement aux modèles d'immobilisation, de suspension unilatérale ou de dénervation, ces modèles permettent d'étudier, les effets de l'impesanteur et/ou de l'hypoactivité sur le corps entier et d'avoir une analyse physiologique et intégrée de l'étude de ses conséquences.

## B. L'hypoactivité altère les performances physiques

D'un point de vue global, l'hypoactivité est associée à une réduction de nombreux paramètres en relation avec la performance physique : vitesse maximale aérobie (VMA),  $\dot{V}O_{2max}$ , endurance, force et profil force-vitesse (notions définies dans le tableau n°2). Ces altérations ont des conséquences importantes, que ce soit pour l'astronaute ou le patient. En effet, la performance physique des astronautes, en situation d'impesanteur ou de gravité partielle, constitue un enjeu majeur pour la réussite des missions (caractérisées par des efforts prolongés) qui leur sont confiées (i.e. sorties extravéhiculaires, exploration ou encore situations d'urgence) (Adams et al., 2003; Hackney et al., 2015). Parallèlement, chez le patient, la réduction de la capacité aérobie représente en plus de la cause initiale d'hospitalisation, un facteur aggravant altérant sa capacité à récupérer et à supporter un traitement médicamenteux l'engageant dans une spirale de déconditionnement (Covinsky et al., 2003). L'état de santé s'aggrave alors, induisant des complications qui augmentent les temps d'hospitalisation, notamment chez les personnes âgées (Covinsky et al., 2003).

### 1) $\dot{V}O_{2max}$ et endurance

L'étude de Trappe et al. comparant les effets du vol spatial et de l'alitement montre un impact similaire sur la  $\dot{V}O_{2max}$  avec une diminution de près de 10% chez 4 astronautes après une mission de 17 jours et de 7% chez 8 sujets après un alitement de même durée (Trappe et al., 2006). Chez l'astronaute, malgré les contre-mesures physiques réalisées, la  $\dot{V}O_{2max}$  diminue de presque 20% après 15 jours de vol et se stabilise jusqu'à la fin de leur mission (i.e. 180 jours) (Moore et al., 2014). L'hypoactivité lors de vol spatiaux de longue durée est également associée à une diminution de la capacité du muscle de répéter un effort sur des protocoles isocinétiques (Gopalakrishnan et al., 2010). Cette fatigabilité musculaire est d'ailleurs confirmée sur des modèles animaux simulant l'impesanteur (McDonald et al., 1992). De plus, des mesures *ex-vivo* montrent que le soléaire de souris soumises à 28 jours de

suspension par la queue est moins endurant et récupère moins bien sa force après un protocole d'endurance (Feng et al., 2016). Les mécanismes à l'origine de la réduction de ces deux paramètres fonctionnels peuvent se situer à différentes étapes du parcours de l'oxygène dans l'organisme : poumons, cœur, sang et bien sûr, muscle squelettique. De longues périodes d'hypoactivité sont effectivement associées à des troubles cardiovasculaires : atrophie du myocarde, réduction du volume d'éjection systolique (Perhonen et al., 2001; Zhang, 2001) ou encore diminution du volume plasmatique (Convertino, 1997; Stegemann et al., 1997) qui, ensemble, altèrent la capacité de l'individu à répondre et à s'adapter à des exercices prolongés. Enfin, les adaptations aérobies en impesanteur sont similaires quel que soit l'âge ou le genre du sujet (Convertino, 2011). Enfin, le déconditionnement à l'effort induit de nombreux troubles musculaires participant à l'altération de la performance aérobie, mais ces répercussions sont telles qu'elles feront l'objet d'un chapitre spécifique dans ce document (cf. page 22).

## 2) Force et profils Force-Vitesse

Une autre conséquence fonctionnelle majeure de l'hypoactivité est la perte de force musculaire, tout particulièrement au niveau des muscles posturaux. En effet, depuis les missions Skylab dans les années 70, il est connu que les vols spatiaux réduisent le pic de force maximale au niveau de différents groupes musculaires (Convertino and Tsiolkovsky, 1990). De manière intéressante, plus le temps passé en impesanteur est long, plus importante est cette perte de force. Après une mission de 6 mois, la diminution de la force de flexion plantaire atteint ainsi 48% tandis qu'en 28 jours de vol, elle se limite à 20% de la force des muscles de la cuisse (Zange et al., 1997). Ces résultats sont en accord avec le modèle de bedrest où 30 jours d'alitement sont associés à une perte de force des extenseurs du genou de l'ordre de 20% chez les hommes et de 10% chez les femmes (Schneider et al., 2016). La méta-analyse de Adams et al. (2003) montre que cette perte de force est majeure au début de l'exposition à l'hypoactivité et se stabilise avec le temps (cf. illustration n°1). Chez l'animal, on retrouve également une diminution importante et rapide de la force maximale du soléaire chez des rongeurs suspendus (Riley et al., 2005). De manière intéressante, après la période de suspension, la force diminue davantage dans les premiers jours post-suspension (Pottle and Gosselin, 2000; Widrick et al., 2008). Ces pertes de force sont accompagnées d'une altération des profils force-vitesse et donc de la puissance musculaire. En effet, chez de jeunes individus

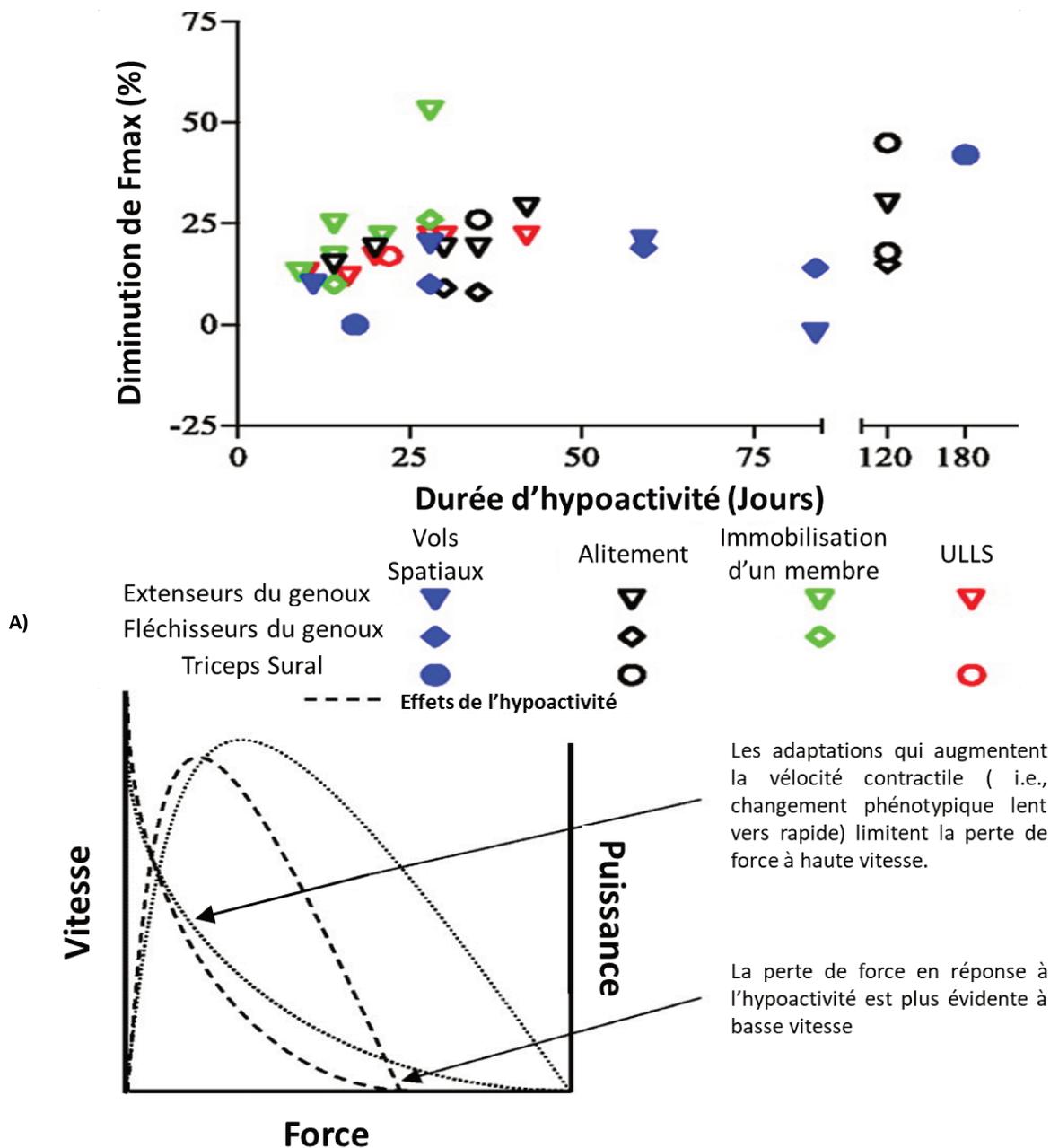
soumis à un protocole ULLS, la force de contraction sur ergomètre isocinétique après 1 et 4 semaines d'exposition est d'autant plus altérée que la vitesse imposée est lente (Berg et al., 1991; Deschenes et al., 2008).

Contrairement à l'endurance, le genre semble influencer la perte de force musculaire en hypoactivité. Ainsi, les hommes perdent visiblement moins de force que les femmes lors de l'immobilisation d'un membre, ce phénomène étant caractérisé par une diminution de l'activation nerveuse du muscle (Deschenes et al., 2009, 2012; Yasuda et al., 2005). De la même manière, l'avancée en âge influence directement la réduction de la force musculaire associée à l'hypoactivité. Ainsi, les sujets âgés perdraient proportionnellement moins de force en réponse à l'hypoactivité que les sujets jeunes, en raison de la sarcopénie déjà apparente et liée au vieillissement (Hvid et al., 2010; Suetta et al., 2009).

Tableau n°2 : Description des paramètres de performances fonctionnelles			
Paramètres de performance	Définition	Méthode de mesure	Déterminants principaux
<b>Vitesse maximale aérobie (VMA)</b>	Vitesse à laquelle l'individu atteint $\dot{V}O_{2max}$	Test incrémental sur piste ou sur tapis de course	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\dot{V}O_{2max}</math></li> <li>- Economie de course</li> </ul>
<b><math>\dot{V}O_{2max}</math></b>	Volume d'oxygène maximum que l'organisme est capable de consommer lors d'un effort intense par unité de temps	Test incrémental sur ergocycle ou sur tapis de course avec mesure des échanges gazeux.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Volume sanguin</li> <li>- Contenu mitochondrial musculaire</li> <li>- Typologie musculaire</li> <li>- Capillarisation musculaire</li> <li>- Débit cardiaque maximal</li> </ul>
<b>Force maximale volontaire</b>	Valeur maximale de la force que peut produire un groupe musculaire lors d'un effort maximal	Exercice isométrique contre la résistance d'un capteur de force <i>in-vivo</i> ou <i>ex-vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Masse du muscle</li> <li>- Typologie musculaire</li> <li>- Stocks en phosphocréatine</li> <li>- Pennation musculaire</li> <li>- Recrutement nerveux</li> </ul>
<b>Force-Vitesse</b>	Profil des valeurs maximales de la force que peut produire un groupe musculaire lors d'un mouvement à différentes vitesses données.	Test charge-vitesse sur ergocycle Test de sauts verticaux avec différentes charges Tests de force à différentes vitesses fixes sur machine isocinétique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Force maximale</li> <li>- Vitesse maximale</li> <li>- Typologie musculaire</li> <li>- Recrutement nerveux</li> </ul>

Tableau n°2 : Les principaux paramètres de performance fonctionnelle

### Illustration n°1 : Impact de l'hypoactivité sur la Force musculaire



Modulation chez l'Homme de la Force Maximale ( $F_{max}$ ) de différents groupes musculaires sur différents modèles d'hypoactivité au cours du temps. Figure adaptée d'Adams *et al.* (2003).

B) Représentation de l'altération de la relation Force-Vitesse en condition d'hypoactivité. Figure adaptée d'Adams *et al.* (2003).

### C. L'hypoactivité induit des altérations physiologiques et organiques

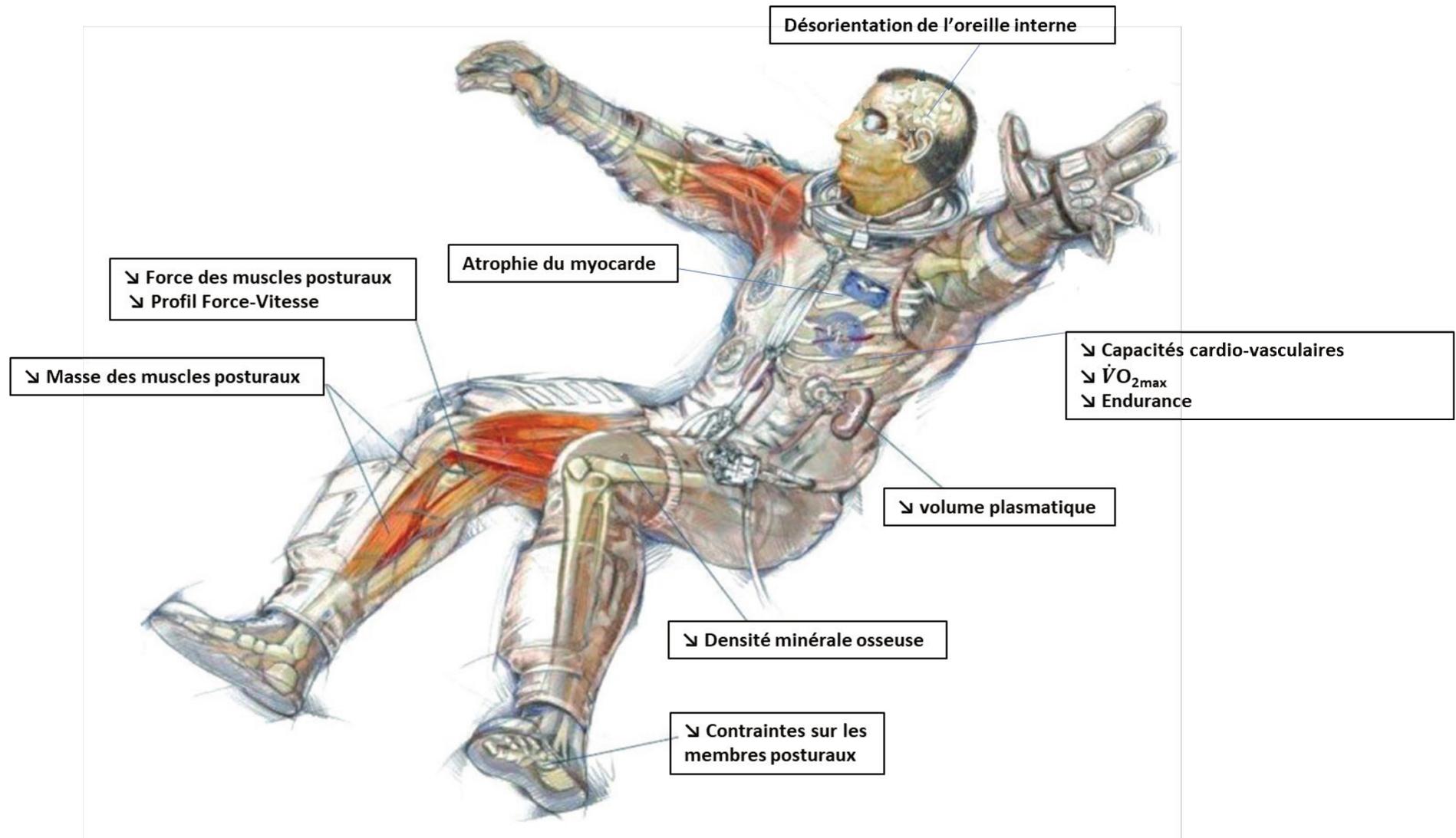
Les altérations des capacités fonctionnelles induites par l'hypoactivité précédemment décrites s'expliquent par un grand nombre de modifications sur différents systèmes physiologiques (cf. Illustration n°2).

Ainsi, les astronautes tout comme les patients alités sont sujets à des troubles de l'équilibre et à des modifications de la perception de leur propre corps dans l'espace (Harris et al., 2017). Les contraintes exercées par l'hypoactivité sur le système musculo-squelettique conduisent au développement d'une fragilité musculaire et d'une ostéoporose précoce. En raison d'absence de contraintes mécaniques habituellement exercées par l'attraction terrestre ou de contractions naturelles du muscle squelettique dans un environnement gravitationnel, le remodelage osseux est affecté avec une résorption accrue au détriment de la formation et de la minéralisation osseuses (Grimm et al., 2016). Cette réduction de densité minérale osseuse touche principalement les os porteurs comme les vertèbres lombaires ou les têtes fémorales (Hargens and Vico, 2016). De plus, lorsque le corps est soumis à l'impesanteur ou à l'alitement, une réduction du volume sanguin s'opère très rapidement en raison principalement d'une diminution du volume plasmatique, ce phénomène étant associé à un remodelage cardiaque (Blomqvist et al., 1994; Buckey et al., 1996). En position verticale et soumis à la pesanteur, le cœur travaille en effet constamment contre la gravité et fait face à un retour veineux peu efficace. En situation d'impesanteur ou simplement en position allongée, les volumes liquidiens sont redistribués dans les parties supérieures du corps et le travail du cœur est réduit pour envoyer un volume de sang équivalent à l'organisme à chaque battement. Par conséquent, le cœur subit un remodelage structurel en situation d'hypoactivité conduisant à une atrophie du ventricule gauche (Dorfman et al., 2007; Zhong et al., 2016). Ainsi, il a été montré par IRM, que la masse du ventricule cardiaque gauche diminuait de 8% après 6 semaines d'alitement et de 10% après un vol spatial de 10 jours (Perhonen et al., 2001).

Même si les conséquences des différentes altérations citées constituent des facteurs clés dans la détérioration de la santé de l'astronaute et du patient alité, ce travail de thèse se focalisera principalement sur les altérations du muscle squelettique et du transport de l'oxygène. En effet, les astronautes en mission, tout comme les patients alités, voient leur masse musculaire se réduire extrêmement rapidement favorisant la perte de force musculaire

(Fitts et al., 2000a). La réduction de la capacité du muscle squelettique à extraire et utiliser l'oxygène associée à cette perte de masse musculaire participe également au déconditionnement de l'individu à l'effort réduisant ainsi sa  $\dot{V}O_{2max}$  (Hoffmann et al., 2016; Levine et al., 1996). De plus, l'atrophie musculaire en situation d'hypoactivité est associée au développement d'une insulino-résistance musculaire, un facteur de risque contribuant à long terme au développement d'un diabète de type 2 (Kenny et al., 2017). Par conséquent, la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires inhérents aux altérations du muscle squelettique et du transport de l'oxygène en hypoactivité devient un enjeu majeur pour préserver l'état de santé et les capacités fonctionnelles de l'astronaute et du patient alité.

## Illustration n°2 : Principales altérations physiologiques et organiques de l'hypoactivité



(copyright image Daniels and Daniels)

## 1) Conséquences spécifiques de l'hypoactivité sur le muscle squelettique

### a) Atrophie musculaire

#### **Effets macroscopiques**

La perte de force musculaire précédemment décrite est en partie liée à l'impact négatif de l'impesanteur sur la taille du muscle. En effet, aujourd'hui, l'induction d'une atrophie musculaire est démontrée dans tous les modèles d'hypoactivité (cf. Tableau n°3). Cette perte de masse musculaire peut être moins marquée lors des vols spatiaux car les astronautes sont soumis à des contre-mesures limitant la perte de masse musculaire (LeBlanc et al., 2000). L'analyse exhaustive de la littérature permet de retenir que ce phénomène n'est en revanche pas systématique sur l'ensemble des 570 muscles striés squelettiques du corps humain. En effet, les muscles posturaux, majoritairement composés de fibres de type I comme le soléaire sont davantage concernés par le déconditionnement musculaire induit par l'impesanteur (Gambara et al., 2017; Miokovic et al., 2012). A l'instar de l'humain, on observe aussi chez l'animal que l'atrophie n'est pas homogène pour tous les muscles puisqu'après à peine 6 jours de vol spatial, on observe une atrophie de 38% pour le soléaire contre une perte de seulement 16% pour le gastrocnémien, tandis que les masses du muscle long extenseur des orteils (EDL) et du tibial antérieur ne sont pas modifiées (Henriksen et al., 1993).

Il existe également un lien proportionnel entre la durée de l'hypoactivité et l'amplitude de l'atrophie (cf. Tableau n°3). En effet, un très grand nombre d'études incluant des protocoles d'alitement allant de 7 à 120 jours indiquent une atrophie des extenseurs du genou et des fléchisseurs plantaires allant de 3% à 30% selon la durée d'alitement (Akima et al., 2001; Alkner and Tesch, 2004a, 2004b; Berg et al., 2007; Convertino et al., 1989; Ferrando et al., 1995; Ferretti et al., 2001; Kubo et al., 2004; Shackelford et al., 2004). L'ensemble de ces données ont conduit à estimer que la diminution de masse musculaire pour les extenseurs du genou et pour les extenseurs du pied était de l'ordre de 0,4% par jour d'alitement (Narici and de Boer, 2011).

Autre élément important caractérisant cette atrophie et à présenter ici : sa cinétique. A ce sujet, une méta-analyse a compilé les résultats d'un grand nombre d'études utilisant les quatre grandes modalités d'hypoactivité chez l'homme (i.e. vol spatial, bedrest, immersion sèche et ULLS) permettant de modéliser la cinétique de perte de masse musculaire dans le

temps. Les conclusions de cette méta-analyse indiquent que la masse musculaire diminue de façon très rapide dans les 2 à 3 premières semaines avant de se stabiliser (Adams et al., 2003). Nous pouvons à nouveau souligner que l'immersion sèche est un modèle d'hypoactivité drastique avec des effets accélérés comparativement au bedrest. En effet, Demangel et al. (2017) ont observé une diminution de 3% de la surface transverse de la cuisse après seulement 3 jours d'immersion sèche, ces résultats étant associés à des réductions de 10 à 15% de la surface de section transverse des fibres selon le type de fibres évalué (Demangel et al., 2017). Chez l'animal, l'une des études les plus spectaculaires montre qu'en seulement deux jours de suspension, la masse du soléaire de rat diminue de près de 20%, soulignant l'importance de cibler cette perte de masse musculaire dès les premières heures et jours d'hypoactivité (Cros et al., 1999). Ces résultats soulignent le caractère adaptatif de cette perte de masse musculaire qui n'est pas continue et linéaire, avec un impact majeur dès les premiers jours, puis une stabilisation une fois que la masse musculaire est adaptée aux contraintes mécaniques réduites en situation d'impesanteur ou d'alitement. Enfin, le dernier élément à prendre en considération est l'importante variabilité interindividuelle reportée sur la variation de la taille des fibres musculaires avec des études observant des diminutions de la taille des fibres de type I allant de 2 à 19% selon les individus (Widrick et al., 1999).

Contribuant à la perte de force ainsi qu'au déficit fonctionnel, l'atrophie musculaire constitue l'un des principaux troubles associés à l'alitement (Borina et al., 2010). En comprendre les mécanismes sous-jacents est un enjeu de taille pour la prévention de la perte de masse musculaire chez les patients alités ou plâtrés ainsi que pour les astronautes (Covinsky et al., 2003).

Tableau n°3 : Hypoactivité et atrophie musculaire chez l'homme et l'animal						
Références	Modèle	Sujets	Durée	Paramètres mesurés	Cible	Résultats
Edgerton <i>et al.</i> , 1995	Vol spatial	3 astronautes	5 jours	CSA fibres	Vaste latéral	-11 à -24% (vs pré-vol)
	Vol spatial	5 astronautes	11 jours	CSA fibres	Vaste latéral	-16 à -36% (vs pré-vol)
LeBlanc <i>et al.</i> , 1995	Vol spatial	4 astronautes	17 jours	IRM surface section muscle	Muscles posturaux	gastrocnémiens -12%; Soléaire -10%; muscle du dos -3%; Psoas -10%; muscles antérieur de la jambe -3%. (vs pré-vol)
Zange <i>et al.</i> , 1997	Vol spatial	3 astronautes	6 mois	IRM surface section muscle	Triceps Sural	-6 à -20% (vs pré-vol)
Ferrando <i>et al.</i> , 1995	Bed rest (BR)	5 hommes	7 jours	IRM surface section	Cuisse	-3% (vs pré-BR)
Tabata <i>et al.</i> , 1999	Bed rest (BR)	9 hommes	19 jours	IRM surface section	Vaste latéral	-7% (vs pré-BR)
Akima <i>et al.</i> , 2001	Bed rest (BR)	15 hommes	20 jours	IRM surface section	Muscles posturaux	Vaste latéral -5%; Vaste interne; -10%; gastrocnémiens -15%; Soléaire -10%; tibial antérieur -8% (vs pré-BR)
Kawakami <i>et al.</i> , 2001	Bed rest (BR)	5 hommes	20 jours	IRM surface section	Muscles posturaux	quadriceps -7%; gastrocnémien -14%; soléaire -13% (vs pré-BR)
Convertino <i>et al.</i> 1989	Bed rest (BR)	8 hommes	30 jours	IRM Surface de section et volume	Triceps Sural	Surface de section -5%; Volume -10% (vs pré-BR)
Berry <i>et al.</i> , 1993	Bed rest (BR)	6 hommes	30 jours	IRM surface de section	Quadriceps, triceps sural	quadriceps -11%; gastrocnémien -8%; soléaire -13% (vs pré-BR)
Alkner <i>et al.</i> , 2004	Bed rest (BR)	9 hommes	30 jours	IRM volume	Quadriceps, triceps sural	quadriceps -10%; Triceps sural -16% (vs pré-BR)
Ferretti <i>et al.</i> , 2001	Bed rest (BR)	7 hommes	42 jours	IRM surface de section	Quadriceps	Diminution de 17% de la surface de section (vs pré-BR)
Miokovic <i>et al.</i> , 2012	Bed rest (BR)	9 hommes	60 jours	IRM surface de section	Muscles posturaux	Vastes -16%; gastrocnémiens -22%, soléaire -23% (vs pré-BR)
Alkner <i>et al.</i> , 2004	Bed rest (BR)	9 hommes	90 jours	IRM volume	Quadriceps, triceps sural	quadriceps -18%; Triceps sural -29% (vs pré-BR)
LeBlanc <i>et al.</i> , 1992	Bed rest (BR)	8 hommes	120 jours	IRM volume	Quadriceps, triceps sural	quadriceps -15%; Triceps sural -30% (vs pré-BR)
Shackelford <i>et al.</i> , 2004	Bed rest (BR)	5 hommes et 4 femmes	120 jours	IRM volume	Quadriceps, triceps sural	quadriceps -16%; Soléaire -29%; gastrocnémien -28% (vs pré-BR)
Demangel <i>et al.</i> , 2017	Immersion sèche	12 hommes	3 jours	IRM surface de section et Histochimie CSA	Cuisse	cuisse -3% et section fibres musculaires -10 à -15% (vs pré-immersion)
Shenkman <i>et al.</i> , 1997	Immersion sèche	?	7 jours	CSA fibres	Cuisse	-18% de section des fibres musculaires (vs pré-immersion)
Miyazaki <i>et al.</i> , 2008	Suspension par la queue	8 rats	7 jours	Pesée (poids) et CSA fibres	solaire	Masse : -22% (vs pré-Suspension) CSA : -37% (vs pré-Suspension)
Berthon <i>et al.</i> 2007	Suspension par la queue	7 rats	5 jours	Pesée (poids)	solaire	-26% (vs control)
			10 jours	Pesée (poids)	solaire	-38% (vs control)
Derbre <i>et al.</i> , 2012	Suspension par la queue	7 rats	14 jours	Pesée (poids) et CSA fibres	solaire	Masse : -49% (vs pré-Suspension) CSA : -69% (vs pré-Suspension)
Cros <i>et al.</i> , 1999	Suspension par la queue	9 rats	2 jours	Pesée (poids)	solaire	-20% (vs pré-Suspension)
	Suspension par la queue	9 rats	4 jours	Pesée (poids)	solaire	-22% (vs pré-Suspension)
	Suspension par la queue	9 rats	8 jours	Pesée (poids)	solaire	-39% (vs pré-Suspension)
	Suspension par la queue	9 rats	21 jours	Pesée (poids)	solaire	-41% (vs pré-Suspension)
	Suspension par la queue	9 rats	28 jours	Pesée (poids)	solaire	-46% (vs pré-Suspension)

Tableau n°3 : Atrophie musculaire en réponse à l'hypoactivité

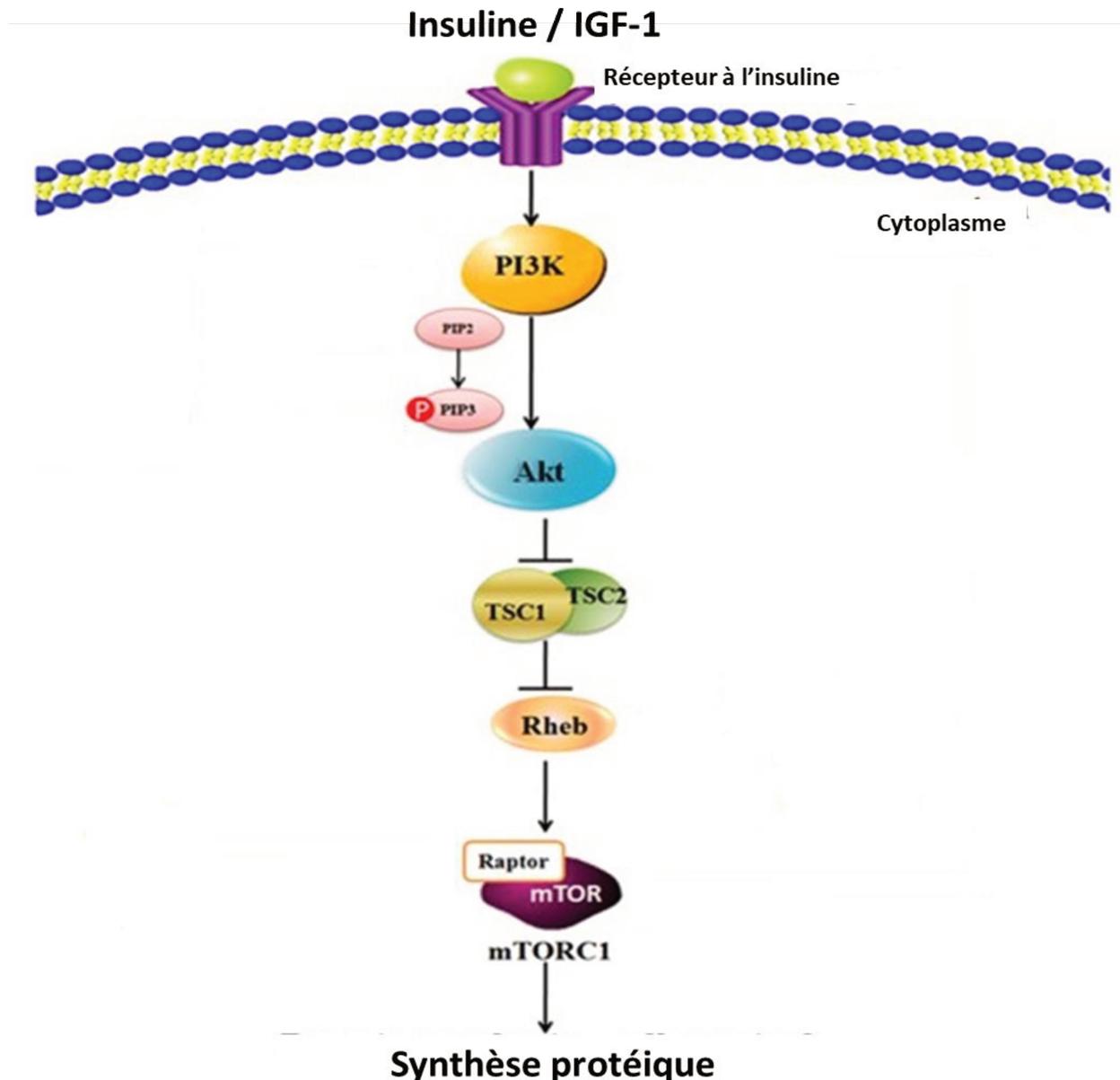
### **Mécanismes cellulaires sous-jacents**

Le muscle squelettique est un organe plastique et sa masse dépend de l'équilibre entre protéosynthèse et protéolyse assurant un renouvellement protéique perpétuel, et dont les mécanismes sous-jacents sont explicités par les illustrations n°3 et n°4. Dans des conditions normales, ce renouvellement maintient la masse musculaire tout en assurant le remplacement des protéines dysfonctionnelles nécessitant une dégradation. Cette dégradation est primordiale pour maintenir la biodisponibilité en acides aminés pour la synthèse protéique. En considérant qu'un individu ingère environ 1 g de protéine par kilogramme de poids de corps par jour via son alimentation, on considère qu'entre 3,5 à 4,5 g/kg de protéines sont synthétisés et dégradés chaque jour. Pour une personne de 70 kg, cela correspond à 280 g de protéines renouvelées par jour soit la quantité totale de protéines dans un muscle de 1,5 kg (Mitch and Goldberg, 1996). Dans le contexte de l'hypoactivité, ce système se retrouve déséquilibré et le renouvellement des protéines n'arrive plus à compenser leur dégradation. La diminution de la protéosynthèse et l'augmentation de la protéolyse en sont à l'origine.

Il est aujourd'hui reconnu que les modèles d'hypoactivité induisent très rapidement des altérations des flux de synthèse au niveau musculaire (Glover et al., 2008; Kortebein et al., 2007; Wall et al., 2013). Ainsi, 14 jours d'alitement diminuent la synthèse protéique d'environ 50% au niveau musculaire (Ferrando et al., 1996; Paddon-Jones et al., 2004). De nombreuses études utilisant des modèles de suspension ou de dénervation chez l'animal montrent une diminution de l'expression musculaire de l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1) ainsi qu'une altération de l'activation de certains marqueurs associés à la voie de synthèse protéique Akt/mTOR/S6k1 (Bodine et al., 2001; Hanson et al., 2013; Hornberger et al., 2001); (cf. illustration n°3)

Cependant, le rôle d'une dérégulation de cette voie Akt/mTOR/S6k1 demeure controversé (Crossland et al., 2019). En effet, certaines études n'observent aucune altération des états de phosphorylation ou des contenus protéiques pour Akt, S6K1, 4E-BP1 et eIF-4E après 10 et 21 jours de suspension chez le rongeur (de Boer et al., 2007). De manière intéressante, la temporalité semble aussi importante à prendre en compte dans ces mécanismes puisque la synthèse protéique est altérée dans les 3 premiers jours d'hypoactivité chez l'animal et demeure diminuée de manière stable par la suite (Baehr et al., 2017).

### Illustration n°3 : Voie de signalisation principale régulant la protéosynthèse



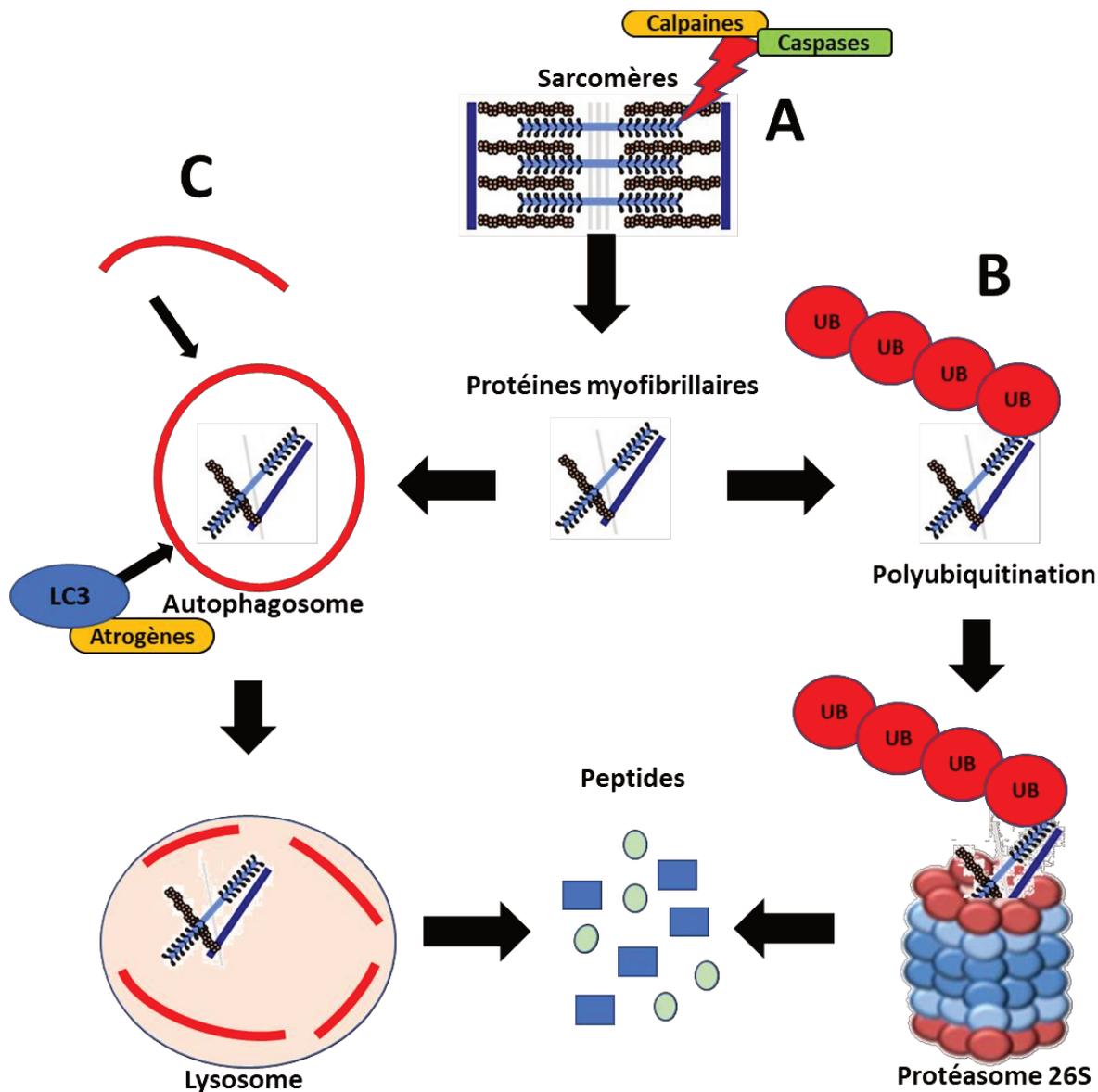
La protéosynthèse ou synthèse protéique est principalement régulée par la voie PI3k/Akt/mTOR (Mounier et al., 2011). PI3k est activée notamment par l'insuline ou IGF-1 (White, 2016). La forme active de PI3K augmente ensuite l'activité de la kinase Akt qui phosphoryle à son tour TSC1 sur les résidus sérines 939/981 et thréonine 1462, inhibant ainsi l'activité du complexe suppresseur de tumeur TSC1/TSC2. La protéine Rheb dépendante de l'activité de TSC2 se retrouve alors activée permettant l'activation du complexe mTOR (Mammalian Target of Rapamycin). Une fois mTOR activée, son complexe mTORC1 phosphoryle 4E-BP1 et ensuite S6K1 et initie finalement la traduction protéique en phosphorylant la protéine ribosomale S6 (Lang et al., 2007). Figure adaptée de Fang *et al.* (2013).

D'un autre côté, la protéolyse musculaire est un mécanisme essentiel puisqu'il permet entre autre de dégrader les protéines en mauvais état pour les transformer en acides aminés qui seront réutilisés par l'organisme. Le système protéolytique au niveau musculaire est régulé par 3 grands systèmes travaillant de manière complémentaire et coordonnée : le système des protéases, le système ubiquitine-protéasome et l'autophagie décrits dans l'illustration n°4.

L'impact de l'hypoactivité sur les mécanismes de protéolyse est aujourd'hui bien documenté. En condition d'hypoactivité, les 3 systèmes se retrouvent suractivés et agissent en synergie avec l'altération de la protéosynthèse induisant progressivement une atrophie musculaire (Pierre et al., 2016). Cette suractivation de la protéolyse s'opère dans les premiers jours d'hypoactivité comme la diminution de la protéosynthèse. Cependant, contrairement à cette dernière, la protéolyse revient à un état basal avec le temps. Il a par exemple été montré sur un modèle de rongeur que les processus protéolytiques étaient suractivés dès les tous premiers jours de dénervation mais reviennent à des niveaux d'activation normaux après 14 jours (Nakao et al., 2015).

Sur un modèle de suspension chez l'animal, l'activation du système ubiquitine-protéasome est relativement rapide puisqu'on observe une augmentation de l'activité des protéasomes 20S et 26S dès les premiers jours de suspension (Baehr et al., 2017; Berthon et al., 2007; Derbre et al., 2012). Ce phénomène s'accompagne d'une augmentation de la transcription de gènes codant pour MuRF1 et MAFbx dans les muscles des animaux suspendus (Baehr et al., 2017; Derbre et al., 2012). De même, il a été montré chez la souris et le rat que l'hypoactivité induite par la suspension par la queue augmente l'expression de p62 et de LC3 dans le muscle soléaire témoignant d'une activation de l'autophagie (Cannavino et al., 2014; Dupré-Aucouturier et al., 2015). Aussi, la suspension chez le rongeur augmente l'activité des caspases après 5 et 10 jours de protocole (Berthon et al., 2007). Enfin, une étude montre que l'inhibition de l'activité des calpaïnes limite la perte de force et de masse du soléaire durant les 9 premiers jours de suspensions mais pas au-delà (Salazar et al., 2010)

### Illustration n°4 : Principaux processus de protéolyse



**A) Le système des protéases :** Parmi les protéases ayant un grand rôle dans la dégradation des protéines musculaires, les plus connues sont les calpaines et la caspase 3. Ces dernières ciblent dans un premier temps et dégradent certaines protéines du sarcomère et des costamères entraînant une rupture du cytosquelette d'actine et la désorganisation des adhérences des différents myofilaments entre eux (Powers et al., 2015) **B) le système ubiquitine-protéasome :** il dégrade les fragments restants des myofilaments issus de la dégradation des sarcomères. Ce système fonctionne en deux grandes étapes. La protéine myofibrillaire à dégrader est d'abord "marquée" par conjugaison covalente de chaînes d'ubiquitine (Ub) grâce à une cascade d'enzymes spécialisées, et notamment les ubiquitine ligases MuRF1 et MAFbx (de Palma et al., 2008). Ces chaînes permettent ensuite la reconnaissance et la dégradation des molécules polyubiquitinylées par un complexe protéolytique de 2000 kDa, le protéasome 26S (Hershko et al., 1998). **C) L'autophagie :** Le système autophagique complète le système ubiquitine/protéasome. Ce système implique plus d'une trentaine de protéines appelées atrogènes, et débute par la génération d'une vésicule à double membrane, appelée autophagosome qui englobe une partie du cytoplasme, des organites, du glycogène et des débris de protéines. Ensuite, cet autophagosome fusionne avec un lysosome afin de dégrader son contenu (Sandri, 2010). Tout comme le système protéasome 26S, l'autophagosome cible les protéines myofibrillaires marquées par l'ubiquitine. Brièvement, la protéine ou l'agrégat de protéines marquées par l'ubiquitine ciblé est dirigé vers l'autophagosome grâce au pontage de la protéine p62 qui possède un domaine de liaison également avec la protéine autophagique LC3. Ce mécanisme permet ainsi à l'autophagosome d'absorber les protéines myofibrillaires.

Les différents mécanismes impliqués dans l'atrophie musculaire sont régulés par une multitude de facteurs intracellulaires et/ou systémiques (Jackman and Kandarian, 2004). La myostatine, est par exemple une protéine régulant négativement la croissance musculaire (Ploquin et al., 2012; Rodriguez et al., 2014) dont l'expression augmente dans le muscle chez le rat en situation de micro-gravité (Lalani et al., 2000). Par ailleurs, les glucocorticoïdes tels que la cortisone et le cortisol, connus également pour activer les processus atrophiques, présentent des concentrations sanguines augmentés en impesanteur (Yang et al., 2017). En revanche, la testostérone, hormone stéroïdienne anabolisante n'est pas modulée en impesanteur chez l'humain, mais est réduite chez le rongeur sur le modèle de suspension par la queue (Kamiya et al., 2003; Smith et al., 2012). Les statuts pro-inflammatoire et pro-oxydant, considérés également comme des acteurs clés dans l'atrophie musculaire, sont tous deux augmentés par l'hypoactivité au niveau musculaire et systémique (Capri et al., 2019; Lawler et al., 2003; Pierre et al., 2016; Smith, 2018). Enfin, la résistance à l'insuline et à l'anabolisme du muscle squelettique que nous développerons ultérieurement constituent des altérations métaboliques qui favorisent également l'atrophie musculaire en situation d'hypoactivité (Rudrappa et al., 2016; Shimkus et al., 2018).

L'atrophie musculaire joue évidemment un rôle central dans la perte fonctionnelle de force (Adams et al., 2003). Cependant, la corrélation entre atrophie et perte de force n'est pas toujours évidente (Fitts et al., 2000a). Une altération de la commande nerveuse est envisagée (Clark et al., 2006), sans avoir été clairement démontrée. Pour répondre à la controverse, certaines équipes aujourd'hui proposent un indice de qualité musculaire en normalisant la force maximale par l'aire de section transversale (CSA) du muscle impliqué (Lee et al., 2015; McGregor et al., 2014; Metter et al., 1999). Cet indice a même été transposé à la fibre musculaire isolée. Ainsi, après 90 jours de Bedrest, Trappe *et al.* (2004) notent une diminution de la force des fibres isolées du vaste latéral indépendamment de leur surface de section, confirmant que l'atrophie n'est pas la seule responsable de la perte de force musculaire en hypoactivité. Certains auteurs expliquent ce phénomène par une diminution de la concentration de myofilaments par unité de muscle limitant ainsi les qualités contractiles de la cellule musculaire sans que son volume ne soit réduit (D'Antona et al., 2003; Miljkovic et al., 2015). La perte de force peut aussi être associée à une diminution de l'activation nerveuse du muscle squelettique (Fitts et al., 2000a). Certaines études ont en effet observé chez le singe que le vol spatial réduit l'activité électromyographique des muscles de leur membres

inférieurs (Fitts et al., 2000b). Ceci pourrait s'expliquer par la sensibilité réduite des myofibrilles aux ions  $Ca^{2+}$  après une période d'hypoactivité, mais aussi à une accélération du recaptage de ces ions par le réticulum sarcoplasmique lors de la contraction (Caiozzo et al., 1996; Holy and Mounier, 1991). Enfin, outre l'atrophie, la perte fonctionnelle musculaire est aussi due à une modification du phénotype contractile (Clark et al., 2006).

#### *b) Modifications du phénotype contractile*

Le muscle squelettique humain est composé d'un ensemble hétérogène de différents types de fibres musculaires avec des propriétés intrinsèques particulières qui définissent son phénotype musculaire (Staron, 1997). Ce phénotype peut être appréhendé de deux manières distinctes, avec tout d'abord un aspect quantitatif faisant référence à la masse du muscle, dépendant lui-même de la taille et du nombre de fibres qui le composent (cf. paragraphe précédent). Mais le muscle squelettique doit être appréhendé également de manière qualitative, c'est-à-dire en fonction des protéines spécifiques et des organites qui composent les fibres musculaires et qui déterminent son phénotype contractile et métabolique.

Il existe trois grandes composantes qui permettent de caractériser les propriétés contractiles du muscle : sa vitesse de contraction et de relâchement, sa force développée et sa résistance à la fatigue. Certains muscles ont de grandes qualités de force et de vitesse mais sont très fatigables, on parle de muscle rapide, comme le muscle long extenseur des orteils (EDL). A l'inverse, les muscles définis comme lents sont plus endurants mais ont des pics de vitesse et de force nettement inférieurs à leurs homologues rapides, c'est par exemple le cas du soléaire. Ce qui va définir la propriété rapide ou lente d'une fibre musculaire va avant tout être sa structure biochimique. En outre, les propriétés contractiles de la fibre musculaire dépendent de sa composition en isoformes de protéines contractiles comme les chaînes lourdes de myosine (MHC). Par exemple, les muscles posturaux comme le soléaire sont souvent définis comme lents puisqu'ils sont principalement constitués de fibres contenant l'isoforme MHC lent (MHC I) alors que d'autres muscles moins impliqués dans la posture tels que les muscles des mains sont composés majoritairement des différents isoformes rapides (MHC-IIa et MHC-IIx). Dans le cadre de la recherche sur le muscle squelettique qui implique souvent des modèles animaux, il est important de noter que, chez le rongeur par exemple, il existe un isoforme rapide n'existant pas chez l'humain : la MHC IIb (Schiaffino et al., 2007). La fibre lente et la fibre rapide se différencient également par leur mode d'utilisation des

substrats énergétiques préférentiels. La fibre lente se fournit en énergie principalement grâce au métabolisme oxydatif. Ce dernier consiste en l'utilisation la plus écologique possible des substrats énergétiques glucidiques et lipidiques grâce à de nombreuses réactions enzymatiques alliées à l'utilisation de l'oxygène au niveau mitochondrial. Pour assurer la fourniture et l'utilisation de l'oxygène, la fibre lente dispose d'une capillarisation supérieure et d'un contenu en myoglobine et mitochondrial augmenté par rapport à la fibre rapide. Cette dernière, quant à elle, se repose sur le métabolisme glycolytique qui n'utilise que la phosphocréatine et les glucides en tant que substrats énergétiques permettant une fourniture d'énergie rapide et conséquente, mais extrêmement peu durable. Ces différentes caractéristiques typologiques de fibres illustrent la plasticité du muscle squelettique, capable d'adapter de manière optimale son phénotype aux différentes contraintes qui lui sont imposées.

Ainsi, en condition d'hypoactivité, lorsque les contraintes s'appliquant sur le muscle diminuent drastiquement, on observe un changement typologique musculaire vers un phénotype contractile rapide (Edgerton and Roy, 1994). Chez le rat tout d'abord, les données indiquent que dans les premières semaines de vol spatial, la proportion de fibres de type I diminue au sein des muscles posturaux, tandis que celle des fibres exprimant des isoformes rapides de chaînes lourdes de myosine (i.e. IIa et IIb) augmente. Après 7 jours de vol, Martin et al. (1988) montrent des augmentations de 40 à 50% de fibres de type II dans le soléaire de rats. En revanche, ils n'observent aucune modification du phénotype contractile dans les muscles non-posturaux. Ces données ont d'ailleurs été confirmées lors des vols d'une durée supérieure (Jiang et al., 1992; Miu et al., 1990; Ohira et al., 1992). Les données de Caiozzo et al. (1996) confirment l'augmentation de fibres hybrides exprimant des MHC de type IIa et IIb/x après 6 jours de vol spatial, tandis que l'isoforme IIa était significativement diminué dans le soléaire et le vaste intermédiaire de rats. Chez l'homme, les résultats correspondent à ceux trouvés chez le rongeur avec une proportion réduite de fibres lentes après 11 jours de vol spatial (-48% à -40%), tandis que la proportion de fibres rapides de type IIa passe de 32% à 41% dans le vaste latéral. Cependant, aucune variation de la proportion de fibres rapides de type IIb ne fut constatée (Edgerton et al., 1995). Après 17 jours de vol, Widrick et al. (1999) reportent une diminution significative dans le soléaire des chaînes lourdes de myosine de type I, celle-ci étant associée à une augmentation concomitante du nombre de fibres hybrides exprimant des MHC de type I, IIa et IIb. Ces modifications phénotypiques sont aussi effectives

sur des modèles d'hypoactivité sur Terre. En effet, chez l'Homme, l'alitement prolongé est associé à une diminution de la proportion des fibres de type I et IIa et une augmentation de la proportion de fibres IIx dans le vaste latéral. Chez le rongeur, dans le soléaire de rat qui ne présente quasiment que des fibres de type I, 14 jours de suspension réduisent la proportion de fibre de type I de 92% à 80%, augmentent la proportion de fibre de type IIa de 5% à 12% et permettent l'apparition de fibre de type IIb et IIx (Dupont et al., 2011).

Cette transformation phénotypique peut expliquer en grande partie les altérations fonctionnelles observées au niveau de la force et de l'endurance musculaire. De plus, les fibres de type I sont plus impactées par l'hypoactivité (Yamashita-Goto et al., 2001). Une étude a montré en ce sens que ces dernières perdaient de manière plus importantes leur qualité de force et de vitesse lors d'un protocole d'alitement (Trappe et al., 2004). Ceci pourrait expliquer pourquoi le soléaire, muscle riche en fibres lentes, est plus sensible à l'hypoactivité qu'un muscle rapide comme l'EDL (Yu et al., 2007). En raison de leurs propriétés oxydatives, les fibres musculaires de type I sont plus capillarisées, cependant dans le soléaire, l'altération de force en réponse à l'hypoactivité ne semble pas liée à une altération du flux sanguin (McDonald et al., 1992). Le phénotype lent étant associé à la qualité d'endurance, de telles données sur les changements typologiques apportent ainsi des éléments pour expliquer l'altération de  $\dot{V}O_{2max}$  et de la capacité à maintenir une certaine intensité d'effort après une période d'hypoactivité.

### *c) Modifications du phénotype métabolique*

En parallèle du changement phénotypique contractile, l'hypoactivité induit des changements métaboliques au niveau musculaire ayant pour conséquence d'affecter notamment la flexibilité métabolique de l'individu; autrement dit, la capacité du corps à changer de source d'énergie entre lipides et glucides. Cette flexibilité contrôle la consommation des différents substrats en fonction des besoins énergétiques en régulant notamment l'équilibre glycémie-insulinémie. Lorsque l'organisme est incapable d'adapter correctement l'utilisation des substrats en fonction de leur disponibilité, l'individu se retrouve en situation d'inflexibilité métabolique. Ce trouble énergétique est bien identifié en condition d'hypoactivité musculaire (Bergouignan et al., 2011). Il apparaît d'ailleurs de manière précoce puisqu'après seulement 21 jours d'alitement, des hommes sains présentent déjà des symptômes d'inflexibilité métabolique (Rudwill et al., 2018).

L'une des principales caractéristiques de ce phénomène est une altération de la sensibilité à l'insuline et de la tolérance au glucose (Bergouignan et al., 2011), conduisant à une insulino-résistance. Cette dernière se caractérise par l'association anormale d'une hyperinsulinémie et d'une glycémie normale ou augmentée. L'insulino-résistance est due à la fois à une diminution de l'action de l'insuline au niveau des tissus périphériques et à une augmentation de la production hépatique de glucose. En situation d'hypoactivité, l'individu présente très rapidement des concentrations à jeun en insuline anormalement élevées (Alibegovic et al., 2009; Stuart et al., 1988). De plus, lors de vols spatiaux autour de l'orbite terrestre, les astronautes présentent un taux élevé de peptide-C dans les urines (Stein and Blanc, 2011). Cette augmentation d'excrétion du peptide-C confirme une hyperinsulinémie induite par une résistance à l'insuline musculaire dite périphérique. De manière intéressante, l'impact de l'hypoactivité sur le captage du glucose a été démontré chez l'homme sur des expérimentations d'alitement prolongé. Des études montrent une augmentation de l'insulino-résistance périphérique et une réduction de la tolérance au glucose avec un état de pré-diabète sur des sujets alités après plusieurs jours ou semaines (Lipman et al., 1970, 1972; Lovejoy et al., 1999; Mikines et al., 1991). Comme évoqué précédemment, ces mécanismes se mettent en place très rapidement puisque certaines équipes constatent une baisse de tolérance au glucose dès 3 à 7 jours d'alitement (Biensø et al., 2012; Smorawiński et al., 2000; Stuart et al., 1988). Ces résultats ont été confirmés chez le rongeur en suspension (Mondon et al., 1992). Cette diminution du captage du glucose en condition d'hypoactivité au niveau des muscles squelettiques est à mettre en lien avec la diminution du nombre des transporteurs de glucose au sein de ces cellules (i.e. GLUT4), et avec un défaut de la translocation de ces transporteurs à la membrane de ces cellules en réponse à l'insuline (Biensø et al., 2012).

De manière intéressante, une diminution de la capacité d'oxydation des acides gras libres est observée au sein du muscle squelettique suite à un vol spatial (Baldwin et al., 1993). Après 9 jours de vol spatial, les chercheurs montrent une diminution de 37% de la capacité du vaste latéral à oxyder des acides gras à chaîne longue. Ces résultats ont depuis été retrouvés dans un grand nombre d'études utilisant différents modèles d'hypoactivité conduisant à un stockage accru d'acides gras dans le muscle favorisant notamment la synthèse de céramides, des lipides ectopiques impliqués dans l'insulino-résistance (Bergouignan et al., 2011; Bryndina et al., 2014; Kwon et al., 2016; Salaun et al., 2016). Ce stockage accru s'observe à la fois sous

forme de gouttelettes lipidiques au sein des fibres musculaires, mais également sous forme d'adipocytes intramusculaires (i.e. IMAT) comme récemment mis en évidence chez l'homme en réponse à l'hypoactivité, et ce indépendamment de toute modification de la masse grasse de l'organisme (Dirks et al., 2016; Pagano et al., 2018; Rudwill et al., 2018). Ces phénomènes sont probablement des conséquences directes de la réduction concomitante de l'oxydation des lipides au sein du muscle (Bergouignan et al., 2009). De manière cohérente avec la baisse de l'utilisation des lipides, deux semaines de suspension par la queue chez le rat augmentent l'utilisation du glycogène et la production de lactate durant l'électrostimulation du muscle soléaire suggérant une utilisation préférentielle du glucose par le tissu musculaire (Grichko et al., 2000). Ces résultats peuvent être mis en relation avec les changements typologiques induits par les conditions d'impesanteur décrits précédemment : réduction de la proportion de fibres oxydatives de type I et augmentation de celle de type II présentant un métabolisme davantage glycolytique (Borina et al., 2010; Dupont et al., 2011). Cependant, cette utilisation préférentielle des hydrates de carbone au détriment des acides gras en condition d'hypoactivité est aussi observée sur les fibres de type I (Grichko et al., 2000).

Enfin, dans ce contexte énergétique, il paraît important de se pencher sur l'impact de l'hypoactivité sur l'organe principal en charge de l'oxydation des substrats dans le tissu musculaire : la mitochondrie. Cette dernière est connue pour être déterminante dans les efforts d'endurance (Freyssen et al., 1996). En condition d'hypoactivité, Oishi et al. (2008), montrent que l'expression de COX IV et PGC-1 $\alpha$ , deux protéines témoignant du métabolisme mitochondrial, sont réduites dans le muscle de souris suspendues depuis 14 jours. Ce résultat peut être expliqué par la diminution de la proportion de fibres de type I riches en mitochondries (Abadi et al., 2009; Powers et al., 2012). Existe-t-il alors un effet sur la fonction mitochondriale *per se* ? Bladwin et al. (1993) ne montrent aucune variation des marqueurs enzymatiques de la  $\beta$ -oxydation et du cycle de Krebs en condition de d'hypoactivité chez l'animal. Enfin, Bigard et al. (1998) notent que la suspension par la queue induit bien une transition phénotypique du lent vers le rapide mais n'altère pas les propriétés mitochondriales du soléaire suggérant que phénotype contractile et métabolique peuvent être dans certains cas régulés indépendamment dans des conditions d'hypoactivité.

Dans tous les cas, cette modification d'oxydation des substrats énergétiques est très certainement responsable en partie, de la fatigabilité musculaire observée en impesanteur et

sur des modèles de suspension murins, notamment dans le muscle soléaire (Feng et al., 2016; McDonald et al., 1992).

## 2) Conséquences spécifiques de l'hypoactivité sur le transport de l'oxygène

Les altérations des capacités fonctionnelles en condition d'hypoactivité, notamment l'endurance et les déterminants de  $\dot{V}O_{2max}$ , peuvent être dues à une altération du transport d'oxygène au niveau sanguin. Il a en effet été montré que le vol spatial et l'hypoactivité plus généralement sont associés à la mise en place d'une anémie caractérisée par une diminution de la qualité et/ou de la quantité des globules rouges qui transportent l'oxygène (De Santo et al., 2005; Wang et al., 2019).

Ce phénomène peut avoir de multiples causes comme des carences en fer, une diminution du volume plasmatique ou la dégradation des globules rouges aussi appelée hémolyse (Broadway-Duren and Klaassen, 2013; Daughety and DeLoughery, 2017). Ces processus sont observés dans des conditions d'hypoactivité réelle ou simulée (De Santo et al., 2005; Fischer et al., 1967). La diminution de la masse des globules rouges est associée à une altération du renouvellement de ces derniers : l'érythropoïèse. L'hormone régulant ce mécanisme est l'érythropoïétine (EPO) (Jelkmann, 2016). Lors de vol spatiaux et de bedrest sur plusieurs jours, les concentrations d'EPO circulantes sont diminuées (Gunga et al., 1996; Leach et al., 1988). Cependant, une autre étude portant sur 24h d'immersion sèche a obtenu des résultats contradictoires avec les sujets présentant des concentrations en EPO augmentées (Gunga et al., 1996). La procédure de cette expérience nécessitait toutefois un bon nombre de prélèvements sanguins sur une courte période pouvant entraîner une augmentation de l'EPO en condition d'hypo-pression veineuse (Miller et al., 1982). De manière générale, l'impesanteur module l'hématocrite, soit le volume occupé par les hématies dans le sang. En effet, en absence de gravité, le volume plasmatique diminue de manière plus importante et rapide que la masse de globules rouges, faisant augmenter l'hématocrite. De plus, le volume sanguin est redistribué vers les parties hautes du corps. Ces deux phénomènes ont pour conséquence de mimer une trop bonne oxygénation sanguine entraînant probablement un rétrocontrôle négatif pour limiter la production d'EPO et réduire la synthèse de nouveaux hématies (De Santo et al., 2005). D'ailleurs, une étude récente a souligné que quel que soit le type de cellules sanguines, l'hématopoïèse était réduite au sein de la moelle osseuse rouge en réponse à l'hypoactivité (Wang et al., 2019). La réduction de l'EPO en

impesanteur est par ailleurs souvent associée à la dégradation spécifique des "jeunes" hématies (i.e. néocytes ou réticulocytes), ce phénomène étant qualifié de néocytolyse (Risso et al., 2014). Tous ces phénomènes peuvent expliquer l'anémie des vols spatiaux dans la littérature (De Santo et al., 2005).

Face à l'ensemble de ces troubles liés au transport de l'oxygène et au regard de l'impact spécifique de l'hypoactivité sur le globule rouge, la problématique du rôle du fer et de son métabolisme dans les processus physiopathologiques induits par l'hypoactivité se pose. En effet, les globules rouges transportent l'oxygène grâce au cofacteur hème contenant un atome de fer. Il est par ailleurs admis que le métabolisme du fer est étroitement lié au transport d'oxygène puisque des carences en fer sont associées à des troubles anémiques (Johnson-Wimbley and Graham, 2011). Cependant, l'impact de l'hypoactivité sur le métabolisme du fer demeure relativement méconnu. C'est pourquoi, dans la prochaine partie, nous décrirons le métabolisme du fer et tenterons de comprendre comment l'hypoactivité pourrait le moduler.

**En résumé.** L'hypoactivité se caractérise par une absence quasi-totale d'activités musculaires et de contraintes sur l'appareil musculo-squelettique. Certaines personnes y sont confrontées dans des situations très particulières d'immobilisation comme le plâtrage ou l'alitement lors d'hospitalisations. Les astronautes y font aussi face lors de vols spatiaux. Cette hypoactivité génère de nombreux troubles physiologiques et altère ainsi les capacités fonctionnelles d'un individu. Les nombreux modèles expérimentaux mimant l'hypoactivité montrent que le muscle squelettique est l'un des tissus les plus touchés, avec une perte de masse, un changement phénotypique et une altération métabolique induisant des pertes de force et d'endurance musculaire. L'anémie associée à l'hypoactivité joue également un rôle important dans l'altération des capacités fonctionnelles de l'individu en situation d'hypoactivité. Etudier les mécanismes sous-jacents et proposer des stratégies préventives afin de limiter les effets de l'hypoactivité, notamment ceux en lien avec le muscle squelettique représente donc un enjeu scientifique majeur dans les domaines médical et aérospatial.

## II. Le métabolisme du fer : un acteur clé dans les altérations physiologiques associées à l'hypoactivité ?

### A. Homéostasie du fer

#### 1) Généralités

Le fer est le 26<sup>ème</sup> élément chimique du tableau périodique associé au symbole Fe. Il est présent dans l'organisme sous deux formes ioniques : le fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ), insoluble, et le fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) qui est lui soluble. Le passage d'un état à l'autre lui permet ainsi d'accepter ou de donner des électrons lui conférant un rôle clé dans de nombreuses réactions d'oxydo-réduction (Aisen et al., 2001). Le fer est indispensable à l'homéostasie de notre organisme en étant un cofacteur essentiel de diverses enzymes impliquées dans des réactions métaboliques essentielles à la production d'énergie par la chaîne respiratoire mitochondriale ou à la synthèse de l'ADN. Le fer est également un élément central de l'hémoglobine et de la myoglobine, permettant respectivement d'approvisionner les différents organes en oxygène et de le stocker au niveau musculaire. Pour ces raisons, une carence en fer est responsable d'un grand nombre de dysfonctionnements métaboliques. Toutefois, le fer sous forme ferreux ( $Fe^{2+}$ ) est très instable et réactif. Il est à l'origine de la formation de radicaux libres via la réaction de Fenton, conduisant ainsi à générer un stress oxydant provoquant des dommages cellulaires. Pour faire face à cette toxicité, l'organisme développe des mécanismes de transport et de stockage afin de limiter le plus possible la présence de  $Fe^{2+}$  au sein des différents compartiments cellulaires (Viatte, 2006). Malgré ces systèmes de défense, un statut ferrique anormal peut apparaître de manière chronique et entraîner de sévères complications. L'hémochromatose génétique (i.e. absorption et stockage excessifs de fer dans l'organisme) ou une carence en fer (i.e. absorption et stockage insuffisants de fer) augmentent en effet le risque de maladies cardiovasculaires et de diabète (Liu et al., 2009). De plus, des troubles de l'absorption, de l'excrétion et du stockage du fer contribuent au développement de certains cancers comme le cancer du sein (Marques et al., 2014).

La quantité totale normale de fer dans l'organisme se situe aux alentours de 3,5 g pour un homme et 2,5 g pour une femme. Il est principalement présent dans l'hémoglobine des globules rouges représentant environ 70% du fer total de l'organisme. Le reste est essentiellement présent dans la myoglobine musculaire (i.e. 20% du fer total) et dans différents types d'organites cellulaires (Brissot and Loréal, 2016). Le fer a la particularité d'être

recyclé en permanence par notre corps. Les pertes quotidiennes en fer sont extrêmement faibles en raison de l'absence de système actif d'excrétion (2 mg/jour). Cette dernière est essentiellement passive via la desquamation des cellules cutanées et digestives, de la chute des cheveux, de la transpiration ou des pertes menstruelles chez la femme. Toutes ces excrétions sont compensées par le fer présent dans notre bol alimentaire dont l'absorption est finement contrôlée au niveau du tube digestif (Loréal et al., 2014). Ainsi, pour 10 mg de fer apportés quotidiennement par un régime alimentaire équilibré, seulement 1 à 2 mg sont absorbés au niveau intestinal (cf. illustration n°5).

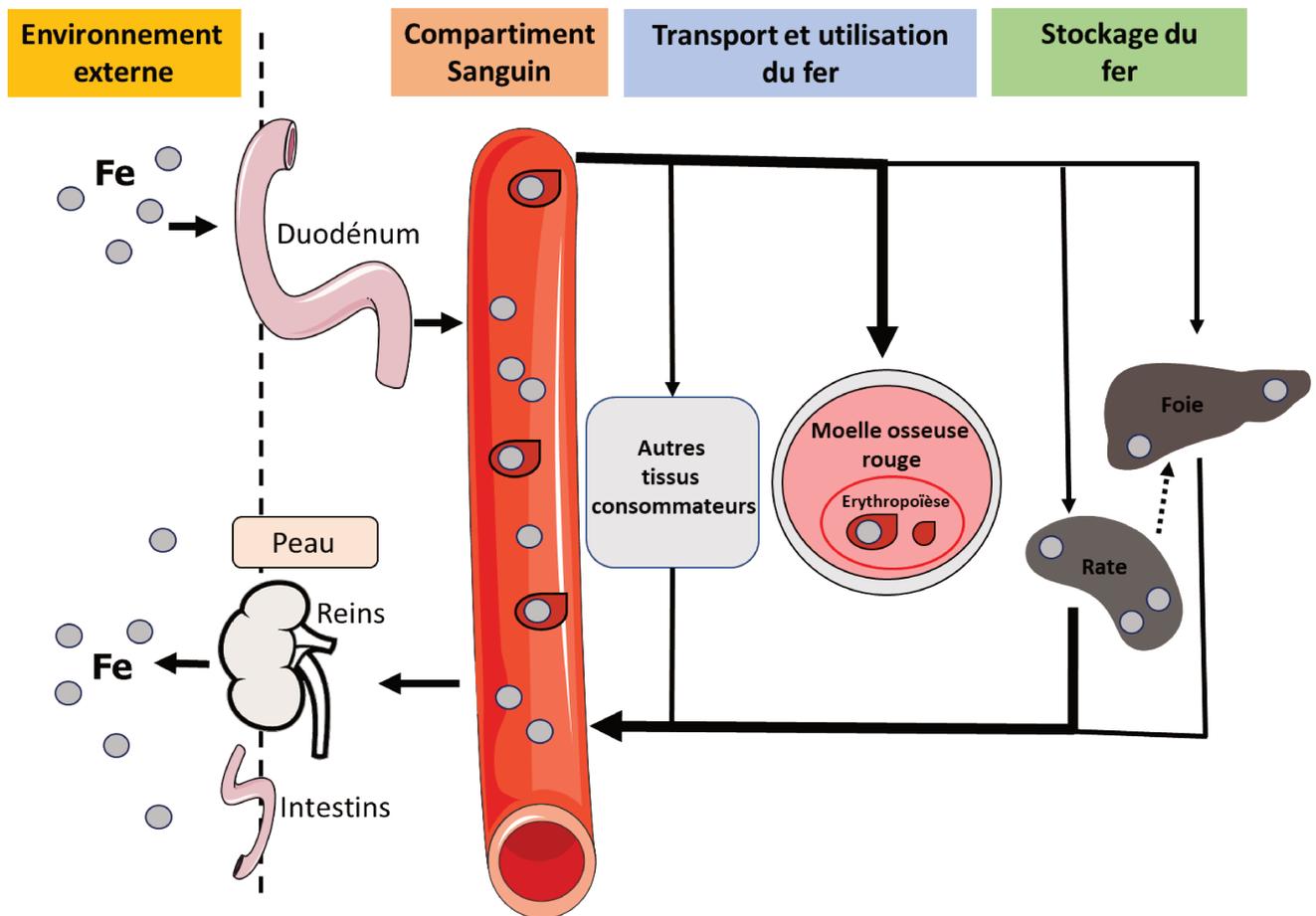
## 2) Absorption intestinale du fer

Le fer provient de l'alimentation sous deux formes distinctes : le fer héminique d'origine animale (i.e. viande et poisson) et le fer non héminique d'origine végétale (i.e. légumineuses, fruits secs). Ce fer est absorbé au niveau de l'intestin grêle et plus particulièrement du duodénum grâce aux cellules des villosités de ce dernier : les entérocytes. Dans la lumière intestinale, le fer non héminique sous forme ferrique ( $Fe^{3+}$ ) est réduit en fer ferreux par l'intermédiaire de la ferriréductase DCTB (duodenal cytochrome b). Les ions ferreux entrent alors dans les entérocytes grâce à un transporteur situé sur leur pôle apical et appelé DMT1 (divalent metal-ion transporter 1). Le fer héminique est quant à lui directement absorbé et réduit par l'hème oxygénase (HMOX) pour le libérer au sein du cytoplasme de l'entérocyte. Une fois dans l'entérocyte, le fer ferreux peut être alors stocké dans la ferritine ou transporté au niveau de la membrane basolatérale vers le sang grâce à la ferroportine (FPN) (cf. illustration n°6).

## 3) Transport plasmatique du fer

Une fois exporté dans le sang, le fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) est oxydé par une ferroxidase appelée héphestine pour redevenir du fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ). Il est alors pris en charge par la transferrine (Tf) circulante, une  $\beta$ -globine d'origine hépatique qui pourra véhiculer le fer dans tout l'organisme (Andrews and Schmidt, 2007). Chez l'homme, environ 90% des 0,6 à 1,8 mg/L de fer sont liés à la transferrine qui elle, est saturée entre 25 et 45% en condition physiologique (Muñoz et al., 2009) (cf. illustration n°6).

## Illustration n°5 : Le fonctionnement général du métabolisme du fer



### Absorption du fer :

Le fer est absorbé au niveau de l'intestin grêle et plus particulièrement du duodénum grâce aux cellules des villosités de ce dernier, les entérocytes.

### Utilisation du fer :

Les cellules se servent du fer absorbé pour synthétiser de nombreuses protéines et organites utilisés dans diverses réactions cellulaires. Le fer est toutefois principalement utilisé lors de l'érythropoïèse dans la moelle osseuse rouge pour se lier au cofacteur hème dans les globules rouges. Le fer présent dans l'hémoglobine des globules rouges représente environ 70% du fer total de l'organisme.

### Stockage du fer :

Lorsque le fer n'est pas utilisé pour les besoins cellulaires, il est stocké sous forme de ferritine dans les organes.

### Recyclage du fer

Pour assurer les besoins en fer de l'organisme, les vieux globules rouges (plus de 120 jours de vie), appelés érythrocytes sénescents, sont dégradés par les macrophages tissulaires principalement au niveau de la rate. Ce processus est appelé érythrophagocytose.

### Pertes du fer :

Elles sont passives via la desquamation des cellules cutanées et digestives, de la chute des cheveux, de la transpiration ou des pertes menstruelles chez la femme.

#### 4) Captage du fer par les cellules de l'organisme

Le fer lié à la transferrine est capté par les cellules cibles via le récepteur de la transferrine 1 (TfR1) situé sur leur membrane. Le complexe Tf/TfR1 rentre dans la cellule par endocytose dans une vésicule. Dans cet endosome, à la faveur d'un PH acide, les ions ferriques se dissocient de la transferrine, puis sont réduits en ions ferreux par une ferriréductase appelée STEAP (six-transmembrane epithelial antigen of prostate) et enfin transportés dans le cytoplasme via DMT1 pour être utilisés par la cellule (Ohgami et al., 2006). Cette forme d'acquisition du fer par les cellules est définie comme étant la principale. Cependant, d'autres voies de captage du fer ont été mises en évidence, notamment pour le fer libre circulant non lié à la transferrine (FNLT ou NTBI pour non-transferrin bound iron) (Baker et al., 1998). Ainsi, Zip 14 fait partie d'une famille de protéines (ZnT) impliquées dans le transport de zinc de l'espace extracellulaire vers l'espace intracellulaire. Cette dernière est néanmoins en mesure de transporter également le fer au sein de la cellule (Coffey and Knutson, 2017). Elle est activée lors d'une réponse inflammatoire face à un pathogène pour limiter la biodisponibilité en zinc pour les micro-organismes (Lichten and Cousins, 2009). Il a été montré que des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-6 (IL-6) induisent une augmentation des contenus en Zip 14 dans la cellule hépatique (Liuzzi et al., 2005). Les cellules se servent du fer absorbé pour synthétiser de nombreuses protéines utilisées ensuite dans divers mécanismes cellulaires. Lorsque les ions ferreux ( $Fe^{2+}$ ) ne sont pas utilisés pour les besoins cellulaires, ils sont stockés sous forme de ferritine puis libérés dans la circulation sous forme ferrique en cas d'excès. Ainsi, les concentrations sanguines en ferritine constituent un indicateur utile aux hépatocytes pour moduler le stockage et l'absorption intestinale du fer.

#### 5) Recyclage du fer

Les besoins quotidiens en fer de l'organisme se situent autour de 8 à 10 mg/jour et sont donc bien plus importants que la quantité de fer absorbée quotidiennement (1 à 2 mg/jour). Ces besoins sont assurés grâce à la mobilisation du fer contenu principalement dans les érythrocytes sénescents (après 120 jours de vie en moyenne) et dégradés quotidiennement par les macrophages tissulaires (Korolnek and Hamza, 2015; Soares and Hamza, 2016). L'hème est ainsi catabolisé par l'hème oxygénase et le fer ensuite libéré par la ferroportine, la protéine d'export cellulaire du fer que l'on retrouve également à la surface des macrophages. Une fois dans le plasma, le fer sous forme ferreux ( $Fe^{2+}$ ) est oxydé par une

ferroxydase cuivre-dépendante appelée céruloplasmine localisée à la surface du macrophage. Le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) est alors pris en charge par la transferrine et transporté vers les organes et cellules cibles. Ce processus appelé érythrophagocytose est essentiel pour satisfaire les besoins quotidiens en fer, et souligne l'importance clé des macrophages dans le stockage et la distribution du fer dans l'organisme (cf. illustration n°6).

#### 6) Rôle clé du foie dans la régulation du statut martial

Le foie a un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme du fer en synthétisant des protéines clés comme la transferrine indispensable à son transport, la céruloplasmine essentielle à son oxydation et l'hepcidine, l'hormone clé dans la régulation du métabolisme du fer (Brissot and Loréal, 2016). Le foie est également un site de stockage majeur avec une capacité d'environ 1 g, ce dernier pouvant accumuler le fer soit directement au sein des hépatocytes, ou bien au sein des macrophages hépatocytaires appelés également cellules de Kupffer. Dans ce cas, le complexe  $\text{Fe}^{3+}$ /transferrine se lie sur son récepteur TfR2 au niveau du foie et va être transporté dans l'hépatocyte via DMT1. Une fois à l'intérieur, ce fer sera stocké en s'associant à la ferritine. En cas de carence en fer, le foie est au contraire capable de mobiliser ses réserves en fer afin de compenser ce déficit. La ferroportine semble être, là aussi, une protéine clé d'export pour l'hépatocyte. En effet, il a été mis en évidence chez des souris KO FPN1, que l'absence de ce transporteur impliquait une accumulation de fer dans les hépatocytes (Donovan et al., 2005) (cf. illustration n°6).

### B. L'hepcidine : le chef d'orchestre du métabolisme du fer

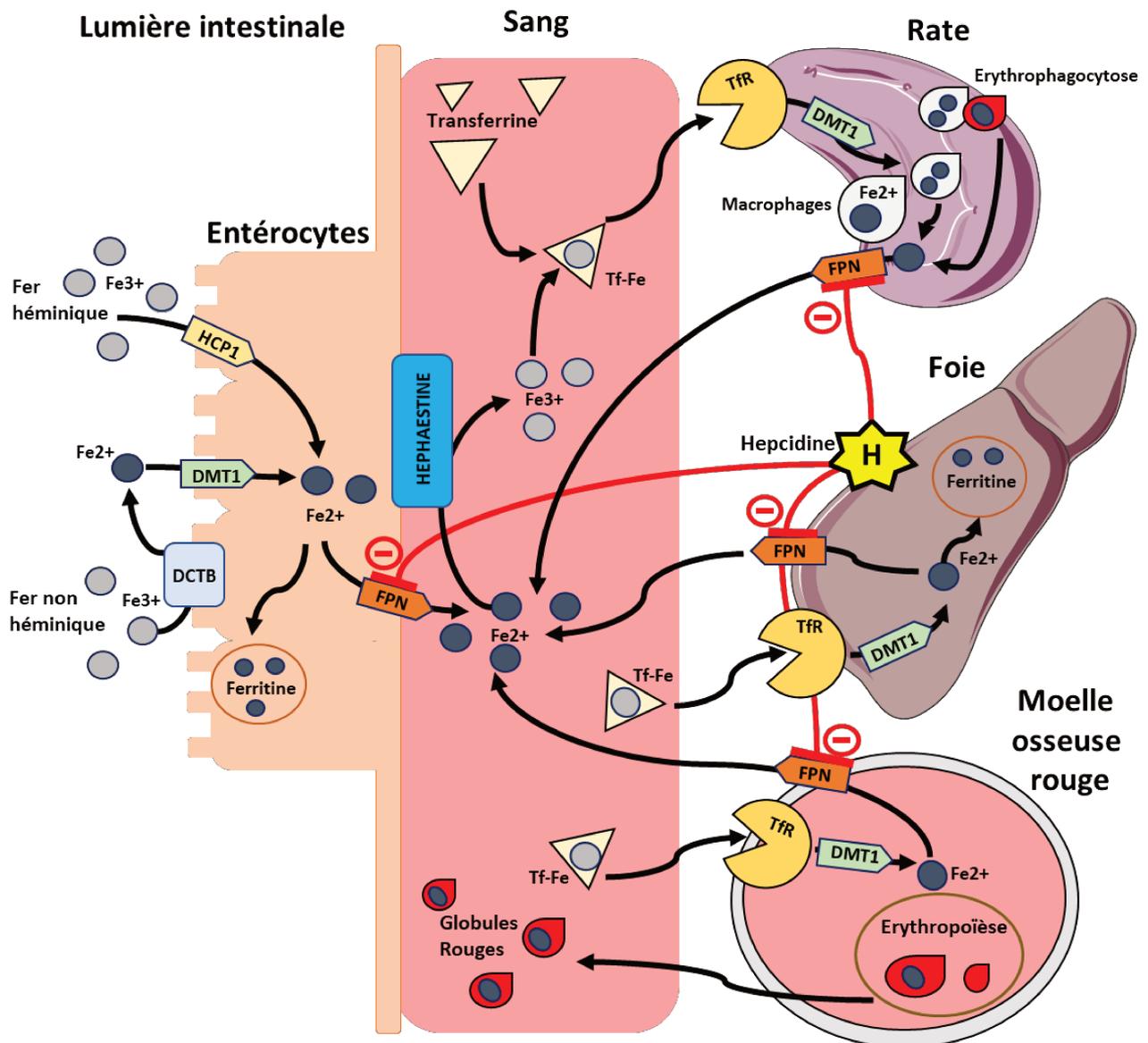
#### 1) Présentation de l'hepcidine

L'homéostasie du fer peut être dérégulée dans différentes situations physiologiques ou pathologiques incluant notamment les carences en fer, un état pro-inflammatoire aigu ou chronique ou encore des mutations génétiques conduisant à une surcharge en fer systémique (i.e. hémochromatose génétique, thalassémie) (Loréal et al., 2014). Ces différentes situations sont intimement liées à la modulation de la synthèse d'une protéine spécifique produite par les hépatocytes et relarguée dans le sang appelée hepcidine.

L'hepcidine, est un peptide de 25 acides aminés mis en évidence en 2001 et présenté à l'origine comme un agent anti-microbien (Krause et al., 2000). Peu après 2001, un

laboratoire démontre le rôle de ce peptide dans le métabolisme du fer en s'appuyant sur un modèle de souris KO pour l'hepcidine (Nicolas et al., 2001). Ainsi, l'hepcidine agit en empêchant à la fois l'export du fer au sein des entérocytes (site de l'absorption), du foie (site de stockage) et des macrophages (sites de recyclage) (cf. illustration n°6). Pour cela, l'hepcidine se lie sur la ferroportine, la protéine d'export du fer présente à la membrane des cellules ce qui déclenche son internalisation et sa dégradation (Ganz, 2005). Cette hormone induit ainsi une réduction des concentrations circulantes en fer et de la saturation en transferrine. Ainsi, lors d'une surcharge en fer plasmatique, la quantité d'ARNm codant pour l'hepcidine dans le foie augmente (Pigeon et al., 2001). À l'inverse, lors d'une anémie provoquée par un régime pauvre en fer, on observe une diminution de ces mêmes niveaux d'ARNm afin de favoriser l'entrée et la mobilisation du fer vers le compartiment sanguin (Frazer et al., 2002). De plus, les mutations du gène HFE impliqué dans la synthèse d'hepcidine sont en général associées à une hepcido-déficiência à l'origine d'une absorption excessive de fer menant à une surcharge systémique appelée hémochromatose génétique (Loréal et al., 2008). De nombreux travaux menés au cours des 10 dernières années ont permis de mieux identifier et comprendre les voies de signalisation cellulaires impliquées dans la régulation de l'expression de cette hormone.

## Illustration n°6 : L'hepcidine : chef d'orchestre du métabolisme du fer



Le fer ferrique libre présent dans les intestins ( $\text{Fe}^{3+}$ ) est réduit en  $\text{Fe}^{2+}$  par DCTB en entrant dans la cellule de l'entérocyte via le transporteur DMT1. L'hème alimentaire est directement absorbé et le fer est relargué grâce à l'hème oxygénase (HCP1). Le fer quitte l'entérocyte via la ferroportine (FPN) pour se retrouver dans la circulation après avoir subi une oxydation par l'héphaestase pour se lier à la transferrine (Tf). Ce complexe Tf- $\text{Fe}^{3+}$  se lie à ses récepteurs TfR1 et TfR2 sur les cellules cibles (Andrews *et al.*, 2007). Après l'endocytose de TfR1 et l'acidification de l'endosome,  $\text{Fe}^{3+}$  est réduit par STEAP et transporté par DMT1 dans le cytosol afin d'être utilisé ou séquestré sous forme de ferritine. La concentration sanguine en ferritine est ainsi un marqueur de stockage du fer par les organes. Le complexe Tf-Fe peut aussi se fixer sur TfR2 du foie où il sera stocké et activera des voies de signalisations nécessaires à la sécrétion d'hepcidine (H) qui inhibera à son tour l'expression des FPN, ce qui limitera l'absorption du fer par rétrocontrôle négatif (Ohgami *et al.*, 2006).

## 2) Mécanismes stimulant la transcription d'hepcidine

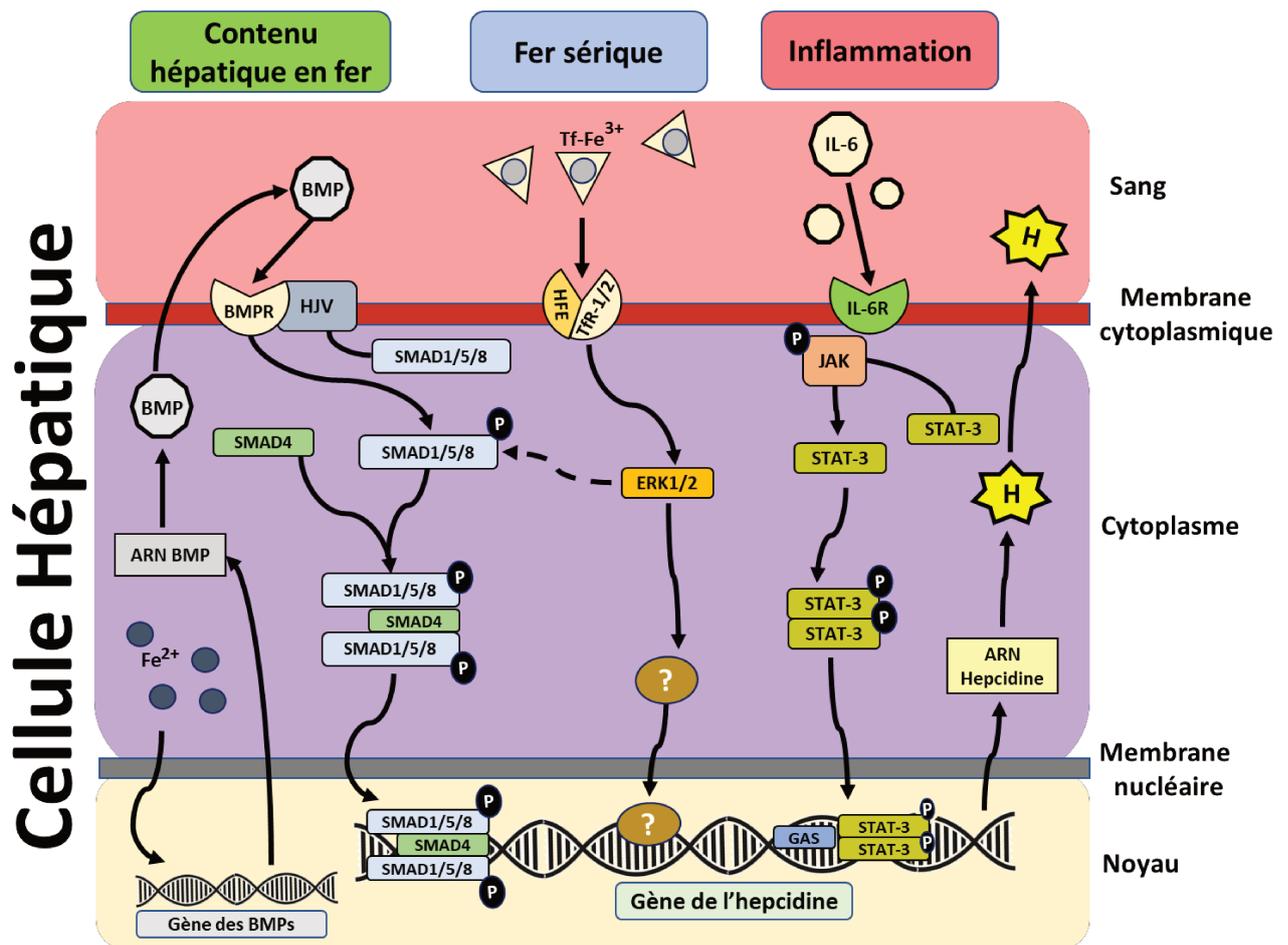
Le statut martial est un facteur central dans la synthèse de l'hepcidine via deux mécanismes essentiels :

Le stock de fer dans l'organisme – Voie BMP/SMAD. Comme précédemment évoqué, le foie est l'organe central dans la régulation du métabolisme du fer. Lorsque les concentrations hépatiques en fer sont trop importantes, la protéine BMP6 (Bone Morphogenetic protein 6) est transcrite par les hépatocytes et relarguée dans le sang. Elle se lie ensuite au complexe formé par son récepteur spécifique de la cellule hépatique appelé BMPr (BMP receptor) et à son co-récepteur l'hémojuvéline (HJV), ce qui permet la phosphorylation de facteurs de croissance de la famille des TGF $\beta$ , les Smad1/5/8. Ces protéines forment ensuite un hétérodimère avec Smad4 permettant sa translocation dans le noyau. Ce complexe transcriptionnel se lie alors sur le promoteur de transcription de l'hepcidine appelé BMP Response element (BMP-RE) (Core et al., 2014). Cette voie est donc finement régulée par le contenu hépatique en fer (cf. illustration n°7).

La biodisponibilité en fer – Voie MAPK/ERK. Lorsque la saturation en transferrine est élevée, la voie de signalisation mettant en jeu les protéines kinases activées par le mitogène (MAPK), ERK1 et ERK2, est activée (Hentze et al., 2010). Ce mécanisme, encore objet de débat, mettrait en jeu la protéine HFE et les récepteurs 1 (TFR1) et 2 de la transferrine (TFR2). Ces récepteurs sont capables de détecter les concentrations plasmatiques en fer par l'affinité qu'ils ont avec la transferrine transportant le fer dans l'organisme. Toutefois, TFR2 a une affinité bien plus faible que TFR1 et a un rôle négligeable dans le captage de fer hépatique. En condition normale, la protéine HFE entre en compétition avec la transferrine pour se fixer à TFR1 en raison d'un site de fixation qui chevaucherait celui de la transferrine. A l'inverse, TFR2 est capable de se lier en même temps à HFE et à la transferrine. Ainsi, en cas de surcharge en fer systémique caractérisée par des concentrations élevées en complexe fer-transferrine, HFE aurait tendance à se lier davantage à TFR2 ce qui aurait pour conséquence d'activer la voie ERK1/2 (Goswami and Andrews, 2006). Cette activation permettrait alors de stimuler un promoteur de transcription de l'hepcidine appelée HAMP (Lawen and Lane, 2013). De plus, ERK1 et ERK2 modèleraient positivement la phosphorylation de SMAD participant ainsi à l'activation de la voie BMP/SMAD (Bayele and Srari, 2009) (cf. illustration n°7).

## Illustration n°7 : Mécanismes stimulant la transcription d'hepcidine

La synthèse d'hepcidine (H) est dépendante de 3 mécanismes :



1. **Le stock de fer dans l'organisme – Voie BMP/SMAD** : Lorsque les concentrations hépatiques en fer sont trop importantes, la protéine BMP6 (Bone Morphogenetic protein 6) est transcrite par les hépatocytes et relarguée dans le sang. Elle se lie alors au complexe formé par son récepteur spécifique de la cellule hépatique appelé BMPr (BMP receptor) et à son co-récepteur l'hémojuvéline (HJV), ce qui permet la phosphorylation de facteurs de croissance de la famille des TGFβ, les Smad1/5/8. Ces protéines forment ensuite un hétérodimère avec Smad4 permettant sa translocation dans le noyau. Ce complexe transcriptionnel se lie alors sur le promoteur de transcription de l'hepcidine appelé BMP Response element (BMP-RE) (Core, Canali and Babitt, 2014)
2. **La biodisponibilité en fer – Voie MAPK/ERK** : Ce mécanisme, encore objet de débat, mettrait en jeu la protéine HFE et les récepteurs 1 (TFR1) et 2 de la transferrine (TFR2). En condition normale, la protéine HFE entre en compétition avec la transferrine pour se fixer à TFR1 en raison d'un site de fixation qui chevaucherait celui de la transferrine. A l'inverse, TFR2 est capable de se lier en même temps à HFE et la transferrine. Ainsi, en cas de surcharge en fer systémique caractérisée par des concentrations élevées en complexe fer-transferrine, HFE aurait tendance à se lier davantage à TFR2 ce qui aurait pour conséquence d'activer la voie ERK1/2 (Goswami and Andrews, 2006). Cette activation permet alors de stimuler un promoteur de transcription de l'hepcidine appelée HAMP (Lawen and Lane, 2013). De plus, ERK1 et ERK2 moduleraient positivement la phosphorylation de SMAD participant ainsi à l'activation de la voie BMP/SMAD (Bayele and Srai, 2009).
3. **Inflammation - Voie JAK/STAT3** : Cette voie est déclenchée par la sécrétion d'IL-6 au niveau circulant qui vient se fixer à son récepteur spécifique sur la membrane des hépatocytes (IL-6R). Cette interaction ligand-récepteur cause la phosphorylation de Janus kinase (JAK) dans le cytosol conduisant à son tour à une phosphorylation du facteur de transcription STAT3. Une fois phosphorylées, deux protéines STAT3 forment un homodimère qui se transloque dans le noyau et se lie au promoteur de transcription de l'hepcidine appelé GAS (l'interféron γ-activation sequence)(Wrighting and Andrews, 2006).

Inflammation - Voie JAK/STAT3. L'inflammation est également un mécanisme régulant positivement l'expression hépatique de l'hepcidine via la voie de signalisation JAK/STAT3. Cette voie est déclenchée par la sécrétion d'IL-6 au niveau circulant qui vient se fixer à son récepteur spécifique sur la membrane des hépatocytes (IL-6R). Cette interaction ligand-récepteur cause ensuite la phosphorylation de Janus kinase (JAK) dans le cytosol conduisant à son tour à une phosphorylation du facteur de transcription STAT3. Une fois phosphorylées, deux protéines STAT3 forment un homodimère qui se transloque dans le noyau et se lie au promoteur de transcription de l'hepcidine appelé GAS (l'interféron  $\gamma$ -activation sequence) (Wrighting and Andrews, 2006). Cette voie de signalisation JAK/STAT3 peut être inhibée dans le cadre d'un rétrocontrôle négatif via SOCS (suppressors of cytokine signaling) et SHPS (phosphotyrosine phosphatases), deux protéines régulées également positivement par IL-6. PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) inhibe quant à elle directement l'activité des promoteur GAS (Bayele and Srail, 2009). De manière intéressante, de récentes études *in-vitro* montrent l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT3 par l'insuline indépendamment de l'inflammation (Wang et al., 2014) (cf. illustration n°7).

### 3) Mécanismes inhibant la transcription l'hepcidine

Il est intéressant de souligner que la synthèse d'hepcidine peut être au contraire inhibée lorsque les besoins en fer sont augmentés, notamment en cas d'augmentation du processus d'érythropoïèse. Plus précisément, des études récentes démontrent que des protéines dérivées des progéniteurs érythroïdes sont impliqués dans l'inhibition de la synthèse d'hepcidine, comme notamment le facteur de différenciation de croissance 15 (GDF-15), le modulateur de signalisation des BMP à gastrulation torsadée (TWSG1) et l'érythroferrone (ERFE) (cette dernière étant produites par les érythroblastes) (Kim and Nemeth, 2015). Plus précisément, lors de l'érythropoïèse, le cortex rénal synthétise de l'érythropoïétine (EPO) conduisant à la synthèse hépatique de GDF-15 qui limite l'activation des SMAD par les BMPs. Cependant, les mécanismes précis pour établir un lien définitif entre GDF-15 et l'inhibition de la synthèse d'hepcidine demeurent encore hypothétiques. D'un autre côté, TWSG1 est une protéine de liaison à la moelle osseuse, sécrétée par les érythroblastes précoces. Certaines études révèlent que la réduction du promoteur de transcription de l'hepcidine induite par TWSG1 passerait par la voie signalisation BMP/SMAD (Tanno et al., 2009). ERFE appartient à la famille des facteurs de nécrose et contribuerait à

réduire la transcription d'hepcidine via la voie des BMP/SMAD et/ou d'autres facteurs encore méconnus (Shenoy et al., 2014). De manière intéressante, cette protéine est aussi connue sous le nom de FAM132b ou de myonectine et serait aussi produite par le muscle squelettique (Lawen, 2015). Enfin, en cas de stress hypoxique, certains facteurs comme la furine ou la transmembrane serine protease 6 (TMPRSS6) sont synthétisés et empêchent les hémojuvélines (HJVs) de s'exprimer sous leurs formes matures au sein des hépatocytes. Ce mécanisme semble également limiter l'activation de voie des SMAD (Kong et al., 2014). De plus, il fut montré récemment que la testostérone était aussi un répresseur de la transcription d'hepcidine en inhibant la voie des SMAD (Guo et al., 2013).

### C. Hypoactivité et métabolisme du fer

#### 1) Etablir le bilan martial d'un individu

Afin de mieux comprendre dans quelles mesures le statut martial peut être modifié en situation d'hypoactivité, il convient préalablement de rappeler les valeurs saines et pathologiques obtenues dans le cadre d'un bilan sanguin et comment interpréter les variations des différents paramètres collectés (cf. tableau n°4). Ainsi, la biodisponibilité en fer permettant d'attester d'une carence, ou au contraire d'une surcharge en fer, est évaluée via la mesure de la saturation en transferrine et des concentrations circulantes en fer. Les valeurs de référence en fer sérique chez un individu masculin en bonne santé sont comprises entre 12,5 et 35  $\mu\text{mol/L}$  de sang. La quantité de fer pouvant être fixée à la transferrine, ajoutée au fer déjà lié, représente la capacité totale de fixation du fer (TIBC). Le rapport des concentrations de fer sérique sur le TIBC représente le coefficient de saturation de la transferrine. Ce dernier doit quant à lui être normalement compris entre 23 et 43% (Taylor et al. 2014). Toutefois, les concentrations en fer sérique combinées à la saturation en transferrine ne sont pas suffisantes pour s'assurer des causes de la carence en fer chez un individu. En effet, une baisse du fer biodisponible peut aussi être due à une augmentation du stockage tissulaire, et pas nécessairement à un apport insuffisant par l'alimentation. Il est donc pertinent d'analyser le coefficient de saturation en transferrine en lien avec les concentrations sanguines en ferritine normalement comprises entre 30 et 300 ng/ml pour établir un diagnostic pertinent (Dine et al., 2010). En effet, on considère qu'un individu présente une carence en fer due à des pertes excessives et/ou à un apport alimentaire insuffisant si la saturation en transferrine et les concentrations sanguines en fer et en ferritine

sont en deçà des normes de référence. A l'inverse, si la biodisponibilité en fer est réduite mais que la ferritine est supérieure aux normes de référence, on considère que cette réduction est due à un stockage tissulaire excessif en réponse à une situation inflammatoire. La mauvaise interprétation de ces analyses conduit parfois à des suppléments inappropriés en fer chez des individus présentant un état inflammatoire aigu ou de bas grade, notamment les sportifs de haut niveau (Maughan et al., 2018). Enfin, un individu est considéré comme présentant une surcharge en fer systémique si la saturation en transferrine, le fer et la ferritine au niveau circulant présentent conjointement des valeurs anormalement élevées.

La méthode IRM est utilisée en clinique suite à un bilan martial anormal afin de localiser plus précisément la localisation du stockage en fer tissulaire (Deugnier and Turlin, 2007). Cette méthode a été validée par l'équipe du Pr Yves Gandon (CHU de Rennes) sur 113 patients soumis à une biopsie hépatique percutanée afin d'évaluer la concentration en fer (Gandon et al., 2004). Pour cela, une IRM à 1.5 Tesla avait été également réalisée sur ces mêmes individus pour établir des corrélations entre les dosages biologiques et l'intensité du signal obtenue par IRM. Un algorithme a ensuite été développé pour quantifier de manière non invasive la concentration en fer dans le foie chez l'homme permettant notamment de diagnostiquer une surcharge en fer hépatique pour des concentrations estimées supérieures à 35 µmol/g. A noter toutefois que la quantification en valeur absolue en fer n'a été validée dans la rate que chez le rongeur en raison notamment des difficultés à obtenir des biopsies spléniques chez des cohortes humaines (Hitti et al., 2010).

<b>Tableau n° 4 : Principaux indicateurs du bilan martial</b>		
<b>Paramètres</b>	<b>Méthode de mesure</b>	<b>Valeurs physiologiques normales chez l'humain</b>
Concentration sanguine en fer	Dosage sanguin	Entre 12,5 µmol/L et 35 µmol/L
Capacité totale de fixation de la transferrine (TIBC)	Dosage sanguin	Entre 45 µmol/L et 72 µmol/L
Saturation en transferrine	Dosage sanguin	Entre 23% et 43%
Ferritinémie	Dosage sanguin	Entre 30 et 300 ng/L
Concentration hépatique en fer	IRM ou biopsie	Inférieur à 35µmol/g

**Tableau n°4 : Principaux indicateurs du bilan martial**

## 2) Effet de l'hypoactivité sur le statut martial

Un certain nombre d'études ont été conduites sur des sujets alités pour explorer les effets de l'hypoactivité sur le statut martial, mais reportent des résultats contradictoires sur certains paramètres. Les études s'accordent pour indiquer que la transferrine circulante diminue après de courtes et longues expositions à une période d'alitement (Morgan et al., 2012; Zwart et al., 2009). Au sujet des concentrations sériques en ferritine, les études sont plus contradictoires : certaines études reportent une élévation après quelques jours d'alitement (Ryan et al., 2016), alors que d'autres études ne reportent aucune variation aussi bien à court et long terme (Morgan et al., 2012; Trudel et al., 2017; Zwart et al., 2009). Il est à souligner qu'aucune étude n'a été réalisée à l'heure actuelle pour explorer les effets de l'immersion sèche sur le statut martial (cf. tableau n°5).

Les données obtenues sur les astronautes lors des 20 dernières années semblent fournir des résultats plus équivoques permettant de mettre en évidence un stockage tissulaire en fer augmenté au détriment d'une éventuelle réduction de sa biodisponibilité. Plus précisément, Zwart et collaborateurs ont observé une diminution des niveaux circulants de transferrine après seulement 15 jours passés dans l'espace, cette diminution perdure jusqu'à 6 mois de vol et ne revient à la normale qu'après 30 jours de retour sur Terre (Zwart et al., 2013). Il est toutefois important de souligner que la concentration en transferrine en tant que telle n'est pas un témoin de la biodisponibilité en fer. Comme évoqué précédemment, la saturation en transferrine est beaucoup plus appropriée pour témoigner du fer biodisponible dans l'organisme. A notre connaissance, aucune étude n'a mesuré ce paramètre chez des astronautes durant un vol spatial. Cependant, une augmentation des concentration sanguines en ferritine est également observée suggérant une modification de la distribution du fer au profit d'un stockage tissulaire (Smith et al., 2005; Zwart et al., 2013). Plus spécifiquement, ce paramètre est augmenté par 2 voire 3 selon les études, et ce, après seulement quelques jours d'exposition à l'impesanteur, ces augmentations perdurant jusqu'à plusieurs mois de vol spatial (Leach, 1992; Smith, 2002; Smith et al., 2005; Zwart et al., 2013). Cependant, les concentrations sanguines en ferritine ne constituent qu'un marqueur indirect du stockage tissulaire, et les organes touchés par ce stockage (e.g. foie, rate, muscle squelettique, cœur, os) demeurent à l'heure actuelle non identifiés. L'ensemble de ces travaux suggèrent donc que, durant le vol spatial, le fer quitterait le compartiment sanguin pour être séquestré dans certains organes. Pourtant, les concentrations en fer circulantes ne semblent pas diminuer

dans l'espace chez les astronautes que ce soit à court et long terme (Zwart et al., 2013). Ce n'est finalement qu'après quelques heures et jours après le retour sur Terre que ce paramètre se retrouve diminué d'environ 25% (Smith et al., 2005; Zwart et al., 2013). Comme évoqué précédemment, il est possible que la diminution de volume plasmatique puisse finalement être à l'origine de l'absence de modifications des concentrations sanguines en fer durant le vol spatial, alors qu'au contraire l'hémodilution induite par l'augmentation du volume plasmatique au retour sur Terre puisse expliquer la diminution de ces concentrations (cf. tableau n°5).

De manière surprenante, aucune étude n'a à l'heure actuelle exploré précisément les mécanismes sous-jacents à la régulation du stockage en fer s'opérant en réponse au vol spatial et l'hypoactivité. A notre connaissance, une seule étude s'est penchée sur les effets du vol spatial sur les concentrations plasmatiques en hepcidine humaine reportant une absence de modifications (Zwart et al., 2013). Les résultats de cette étude demandent clairement à être confirmés par d'autres études cliniques menées chez des astronautes ou des volontaires sains exposés à l'hypoactivité sur Terre. De manière intéressante, il a été observé sur plusieurs études que des volontaires sains exposés à quelques jours ou plusieurs semaines d'alitement présentaient un état inflammatoire de bas grade caractérisé notamment par une augmentation des concentrations plasmatiques en IL-6 (Bosutti et al., 2008; Caron et al., 2009; Jurdana et al., 2015; Kwon et al., 2015a; Mutin-Carnino et al., 2014). Comme décrit précédemment, IL-6 joue un rôle clé pour stimuler la transcription hépatique d'hepcidine via la voie de signalisation JAK/STAT3 (Wrighting and Andrews, 2006) suggérant que l'hypoactivité pourrait favoriser le stockage tissulaire de fer dans des organes présentant une forte quantité de macrophages comme le foie ou la rate. Comme nous l'avons aussi évoqué auparavant, l'hypoactivité induit également une hyperinsulinémie qui pourrait jouer un rôle dans la synthèse d'hepcidine, cette dernière étant positivement régulée par l'insuline via la voie impliquant STAT3 (Wang et al., 2014). Enfin, la testostérone est reconnue comme pouvant réprimer la synthèse d'hepcidine (Guo et al., 2013). Même si les données sur les effets de l'hypoactivité sur les concentrations sanguines en testostérone demeurent contradictoires entre les données obtenues chez l'homme et l'animal (Kamiya et al., 2003; McCall et al., 1997), il n'est pas aberrant de supposer que cette hormone puisse jouer un rôle dans les modifications du statut martial observées en situation d'hypoactivité.

Quel que soit les mécanismes expliquant les modifications du métabolisme du fer en réponse à l'hypoactivité, un certain nombre de travaux laissent supposer que le muscle squelettique joue un rôle clé dans ce processus. En effet, il a été mis en évidence que l'état catabolique des muscles atrophiés en réponse à l'hypoactivité était associé à une augmentation de la production d'IL-6 musculaire aussi bien chez l'homme que l'animal (Caron et al., 2009; Kwon et al., 2015b). Au regard de l'importance de la perte de masse musculaire observée en situation d'hypoactivité, nous pouvons émettre l'hypothèse que le relargage d'IL-6 par les muscles atrophiés puisse affecter la synthèse hépatique d'hepcidine. Ce phénomène a d'ailleurs été mis en évidence par Banzet et collaborateurs chez l'animal en réponse à l'exercice aigu (Banzet et al., 2012). Dans cette étude, les auteurs démontrent que l'exercice aigu induit une augmentation à la fois de la synthèse d'hepcidine hépatique et d'IL-6 musculaire, mais que l'inhibition de la synthèse d'IL-6 par la cyclosporine bloque la synthèse d'hepcidine en réponse à l'exercice. Ces données suggèrent donc qu'un dialogue entre le muscle squelettique et le foie pourrait exister dans la régulation de la synthèse d'hepcidine. A l'inverse, le muscle squelettique qui s'atrophie en réponse à l'hypoactivité pourrait tout aussi bien être un pourvoyeur important de fer vers la circulation sanguine, ce dernier contenant 20% du fer de l'organisme sous forme de myoglobine.

Tableau n°5 : Hypoactivité, métabolisme du fer et transport de l'oxygène chez l'homme					
Références	Modèle	Sujets	Durée	Paramètres mesurés	Résultats
Ryan <i>et al.</i> , 2016	Bedrest (BR)	7 hommes	4 jours	Hémoglobine (g/dL)	+11% (vs pré-BR) et -4% après 5 jours post-BR (vs pré-BR)
				Hématocrite (%)	+11% (vs pré-BR) et -4% après 5 jours post-BR (vs pré-BR)
				Ferritine sérique (ng/mL)	+21% (vs pré-BR)
				Volume plasmatique	-14% (vs pré-BR)
Zwart <i>et al.</i> , 2009	Bedrest (BR)	7 hommes	21 jours	Hémoglobine (g/dL)	+8% après 15 jours de BR et -7% après 8 jours post BR (vs pré-BR)
				Hématocrite (%)	-7% après 8 jours post BR (vs pré-BR)
				Fer sérique (µmol/L)	Non significatif
				Transferrine sérique (mg/dL)	-8% après 15 jours de BR; -10% après 8 jours post-BR (vs pré-BR)
Trudel <i>et al.</i> , 2017	Bedrest (BR)	10 hommes	21 jours	Hémoglobine (g/dL)	+0,6% (vs pré-BR) et +0,3% après 7 jours post-BR (vs pré-BR)
				Hématocrite (%)	+2% (vs pré-BR) et -4% après 7 jours post-BR (vs pré-BR)
				Ferritine sérique (ng/mL)	NS (vs pré-BR) et -25% après 7 jours post-BR (vs pré-BR)
				Fer sérique (µmol/L)	Non significatif
Morgan <i>et al.</i> , 2012	Bedrest (BR)	8 hommes et 4 femmes	30 jours	Hématocrite (%)	-5% après 7 jours post BR (vs pré-BR)
				Transferrine sérique (mg/dL)	-8% après 30 jours de BR (vs pré-BR)
				Ferritine sérique (ng/mL)	+31% après 30 jours de BR (vs pré-BR)
				Fer sérique (µmol/L)	NS (vs pré-décollage)
Smith <i>et al.</i> , 2002	Vol spatial	?	de 2 et 11 jours	Ferritine sérique (ng/mL)	Non significatif (vs pré-décollage)
	Vol spatial	?	de 28 à 84 jours	Ferritine sérique (ng/mL)	≈ +30% (vs pré-décollage)
Zwart <i>et al.</i> , 2013	Vol spatial	16 hommes et 7 femmes	15 jours	Fer sérique (µmol/L)	NS (vs pré-décollage)
				Transferrine sérique (mg/dL)	-10% (vs pré-décollage)
				Ferritine sérique (ng/mL)	+68% (vs pré-décollage)
				Fer stocké mg/kg	+6% (vs pré-décollage)
			60 jours	Fer sérique (µmol/L)	NS (vs pré-décollage)
				Transferrine sérique (mg/dL)	-14% (vs pré-décollage)
				Ferritine sérique (ng/mL)	Non significatif (vs pré-décollage)
				Fer stocké mg/kg	Non significatif (vs pré-décollage)
			180 jours	Fer sérique (µmol/L)	Non significatif (vs pré-décollage) mais -42% au retour sur terre (vs pré-décollage)
				Transferrine sérique (mg/dL)	-10% (vs pré-décollage)
Ferritine sérique (ng/mL)	Non significatif (vs pré-décollage)				
Fer stocké mg/kg	Non significatif (vs pré-décollage)				
Smith <i>et al.</i> , 2005	Vol spatial	9 hommes et 2 femmes	de 128 à 195 jours	Hémoglobine (g/dL)	-4% (vs pré-décollage)
				Hématocrite (%)	-5% (vs pré-décollage)
				Fer sérique (µmol/L)	-34% (vs pré-décollage)
				Transferrine sérique (g/L)	-11% (vs pré-décollage)
				Ferritine sérique (ng/mL)	+46% (vs pré-décollage)

Tableau n°5 : Impact de l'hypoactivité sur le métabolisme du fer et le transport de l'oxygène

3) Le fer : un rôle clé dans les altérations fonctionnelles et métaboliques observées en hypoactivité ?

a) Insulino-sensibilité.

De manière intéressante, un lien entre le métabolisme du fer et les altérations de l'insulino-sensibilité a été mis en évidence. En effet, il existe une corrélation positive entre les concentrations sanguines en ferritine et la sensibilité à l'insuline, et ce indépendamment de l'indice de masse corporelle, de l'âge, du sexe et du statut inflammatoire (Wlazlo et al., 2015). Ce résultat conforte de précédents travaux montrant des concentrations sériques élevées en ferritine chez des individus présentant un risque plus important de développer un diabète de type 2. Un excès de fer dans le muscle, le foie et le pancréas pourrait être à l'origine d'un stress oxydant en raison de la surproduction d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERDO) par la réaction de Fenton (Arruda et al., 2013; Reardon and Allen, 2009). Or, ces espèces réactives sont des acteurs clés dans le développement de l'insulino-résistance des organes insulino-sensibles et sécréteurs (Keane et al., 2015; Pierre et al., 2016). L'ensemble de ces données suggère donc que l'insulino-résistance se développant en réponse à l'hypoactivité pourrait potentiellement être aggravée sur le long terme en cas de surcharge en fer au niveau des principaux organes insulino-sensibles que sont le foie ou le muscle squelettique.

b) Atrophie musculaire.

Le fer pourrait également jouer un rôle dans l'atrophie musculaire induite par l'hypoactivité puisqu'il a été montré que l'excès de fer dans les tissus altère le turnover protéique en favorisant notamment l'activation du facteur de transcription FOXO3 qui régule l'expression des ubiquitines ligases MuRF1 et MAFbox (Ikeda et al., 2016). Il a d'ailleurs été démontré qu'un excès de fer peut être à l'origine d'une altération de la force musculaire du soléaire *ex-vivo* (Liang et al., 2017, 2019). Le stress oxydant induit par une surcharge en fer pourrait être un des facteurs aggravant de ces phénomènes observés en hypoactivité (Pierre et al., 2016; Powers et al., 2005). Des chercheurs ont en effet noté une forte corrélation entre le degré d'atrophie musculaire, les concentrations en ARN oxydés et la concentration en fer non-hémunique dans le muscle de rongeurs suspendus par la queue (Hofer et al., 2008). Or, nous avons montré dans cette revue de littérature que l'hypoactivité conduit à augmenter le stockage tissulaire en fer, et potentiellement au niveau musculaire.

Le stress oxydant est aujourd'hui bien connu pour jouer un rôle dans l'atrophie musculaire *in-vitro* (McClung et al., 2009; Siu et al., 2009; Zhang et al., 2011). Certaines études supportent d'ailleurs le fait que le système ubiquitine-protéasome et l'autophagie sont stimulés par le stress oxydant en condition d'hypoactivité (Pierre et al., 2016). A titre d'exemple, la surexpression musculaire de la catalase, une enzyme anti-oxydante, prévient l'atrophie musculaire observée chez des rongeurs suspendus par la queue (Dodd et al., 2010). Ces résultats sont confirmés par un certain nombre d'autres études utilisant des agents anti-oxydants sur différents modèles d'hypoactivité chez l'animal (Derbre et al., 2012; Lawler et al., 2014; Talbert et al., 2013). L'ensemble de ces travaux suggère donc que le fer en s'accumulant au niveau du muscle squelettique pourrait contribuer à l'atrophie musculaire associée à l'hypoactivité via des mécanismes redox-dépendants.

#### c) L'ostéoporose

Il est à noter que le stress oxydant induit par une surcharge en fer dans l'os joue un rôle clé dans l'ostéoporose, phénomène bien identifié en hypoactivité (Xu et al., 2017; Yang et al., 2017). Des données issues d'études *in-vitro*, *in-vivo* chez l'animal, et cliniques chez l'homme démontrent que l'excès de fer a un effet délétère direct sur le métabolisme osseux (Jeney, 2017). De manière intéressante, différentes études utilisant des modèles de microgravité simulée associent l'augmentation du stockage de fer et du stress oxydant au niveau osseux avec le développement d'une ostéoporose (Morikawa et al., 2013; Yang et al., 2018a; Zwart et al., 2013). D'ailleurs, des stratégies antioxydantes dans des modèles d'hypoactivité chez l'animal préviennent en partie la réduction de la densité minérale osseuse (Sun et al., 2013; Xin et al., 2015). Ainsi, les propriétés pro-oxydantes du fer en font un élément important dans l'étude des altérations structurelles et métaboliques de l'hypoactivité tant sur le muscle squelettique que l'os. Cet élément pourrait aussi jouer un rôle dans l'anémie, une autre altération physiologique observée en hypoactivité.

#### d) Transport de l'oxygène.

L'anémie a aussi été décrite précédemment comme une altération physiologique se mettant rapidement en place en réponse à l'hypoactivité, se caractérisant principalement par une réduction de la masse de globules rouges dans l'organisme. Nous avons précédemment montré que l'hypoactivité réduit vraisemblablement la biodisponibilité sanguine et augmente le stockage intracellulaire de fer. Or, il se trouve qu'un stockage trop important de fer dans les

tissus, notamment lors des processus inflammatoires, diminue la biodisponibilité en fer pour les cellules souches hématopoïétiques et limite ainsi la biosynthèse des globules rouges (Weiss, 2009). Par conséquent, le fer pourrait avoir un rôle clé dans les altérations de transport de l'oxygène observées en condition d'hypoactivité.

**En résumé.** Le fer est un élément chimique indispensable à notre homéostasie. Présent en grande quantité dans les hématies, ses propriétés d'oxydo-réduction lui permettent notamment de faire circuler l'oxygène à travers l'organisme. Le fer est transporté de l'intestin ou des organes vers le compartiment sanguin via une protéine d'export cellulaire appelée ferroportine. L'activité de cette dernière est régulée par l'hepcidine qui induit sa dégradation membranaire, principalement au niveau des entérocytes et des macrophages. L'hepcidine est un peptide d'origine hépatique sécrété lorsque les concentrations sanguines et/ou hépatiques en fer sont trop importantes ou lors d'un état pro-inflammatoire. L'hepcidine peut être régulée positivement par trois voies distinctes : BMP/SMAD ; JAK/STAT et la voie des senseurs MAPK/ERK mais n'est visiblement régulée négativement que par l'inhibition d'une seule de ces voies seulement, la voie BMP/SMAD. De manière intéressante, il semblerait que l'activité physique et musculaire joue un rôle dans les régulations du métabolisme du fer. En condition d'hypoactivité et notamment lors de voyages spatiaux, l'homme présente une diminution des concentrations sanguines en fer ainsi qu'une augmentation du stockage de ce métal. Ce dernier, en favorisant le stress oxydant via la réaction de Fenton, pourrait impacter le muscle squelettique, alors que la réduction de sa biodisponibilité dans l'organisme pourrait contribuer à l'anémie associée à l'hypoactivité. Les mécanismes expliquant la modulation du métabolisme du fer en situation d'hypoactivité, et notamment la régulation de l'hepcidine, demeurent cependant encore inconnus.

### III. Le microbiote intestinal : un acteur clé dans les altérations physiologiques associées à l'hypoactivité ?

L'hypoactivité est un processus global touchant comme nous l'avons vu, différents tissus et organes. Aujourd'hui, les études physiologiques les plus récentes montrent que les organes « dialoguent » ou qu'il existe des voies de communications entre eux, et que l'un peut influencer l'autre. C'est dans ce contexte de cross-talk inter-organe que l'étude de l'influence du microbiote intestinal sur le tissu musculaire squelettique a permis l'émergence d'une problématique originale autour de l'hypoactivité.

#### A. Le microbiote intestinal : une population invisible, anaérobie et hautement diversifiée

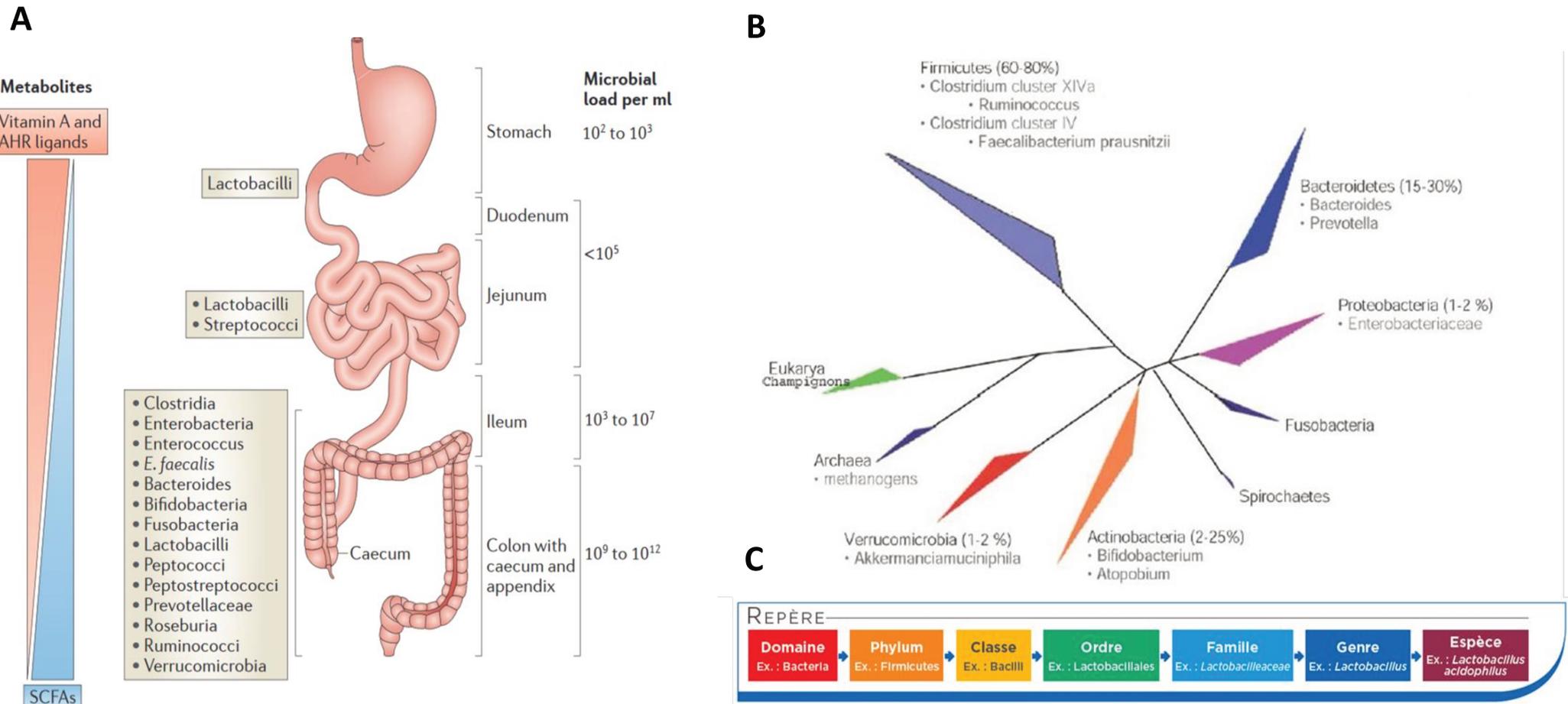
##### 1) Généralités sur le microbiote intestinal

Depuis Pasteur au XIXe siècle, l'évolution de la médecine a permis de percevoir l'infiniment petit, invisible, hostile et dangereux, avec ses acariens disgracieux, infâmes virus, champignons dégoûtants et viles bactéries. Cela eut pour effet de nous plonger dans un monde sale où chaque individu se doit de se défendre à grand renfort de pasteurisation, de d'antiseptiques et d'antibiotiques. Pourtant l'évolution du genre *Homo sapiens* s'est déroulée en étroite collaboration avec un très grand nombre de ces micro-organismes (Bäckhed et al., 2012). Les bactéries ou microbiote sont absolument partout, sur et dans notre corps, au niveau de la peau, de la plaque dentaire, des oreilles, du vagin et du nez (Belizário and Napolitano, 2015). Mais c'est au niveau de l'intestin que nous hébergeons la plus importante concentration de bactéries, avec une estimation de plus de mille espèces différentes, pesant au total 1 à 3 kg de notre poids de corps. Environ 90% des espèces bactériennes de ce microbiote intestinal appartiennent aux phyla (pluriel de phylum) des firmicutes, des bacteroidetes et des actinobacteries (cf. Illustration n°8). Il existe d'autres phyla minoritaires répertoriés comme les protéobactéries et les verrucomicrobia (Arumugam et al., 2011; Qin et al., 2010).

Ces bactéries issues de différents phyla se répartissent de façon non homogène le long du tube digestif, et la majorité des bactéries composant notre microbiote intestinal sont anaérobies, elles n'ont donc pas besoin d'oxygène pour vivre et se développer (cf. Illustration n°8). Les techniques de séquençage à haut-débit utilisées aujourd'hui permettent de

discriminer, sur la base des tableaux d'abondance, toute la richesse du microbiote intestinal, dévoilant notre carte d'identité microbienne, propre à chacun qui va se constituer tout au long de notre vie. La diversité des espèces bactériennes intestinales est très importante et en constitue même l'une de ses caractéristiques. Il existe deux grandes analyses de ce paramètre : l'alpha-diversité ( $\alpha$ -diversité) et la Béta-diversité ( $\beta$ -diversité). L' $\alpha$ -diversité est une mesure indiquant la diversité et l'abondance de différentes espèces au sein d'un même échantillon unique. Différents indices existent dans la littérature pour mesurer ce paramètre comme l'indice de Shannon, le Simpson ou encore le Chao1. La  $\beta$ -diversité quant à elle, consiste à mesurer la diversité des espèces entre les échantillons. En raison du très grand nombre de bactéries pouvant être mesuré dans un échantillon, des analyses bio-informatiques utilisant des méthodes dérivées des analyses en composantes principales (PcoA) sont nécessaires (Schutz, 2016).

## Illustration n°8 : Anatomie de l'intestin et grandes familles bactériennes du microbiote intestinal



**A) Anatomie de l'intestin et répartition bactérienne le long du tube digestif.** (Figure issue de Mowat et al. (2014)).

**B) Représentation schématique de l'arbre phylogénétique des bactéries intestinales montrant l'abondance relative des phyla majoritaires du microbiote intestinal humain.**

**C) Rang taxonomique des bactéries du microbiote intestinal** (Adapté de Cheng et al. (2013))

## 2) Le microbiote intestinal, une carte d'identité propre à chacun pouvant évoluer

L'installation du microbiote intestinal débute à la naissance suivant un principe, premières bactéries installées, bactéries dominantes (Penders et al., 2007). Ainsi, selon le mode de naissance (par voie basse ou par césarienne) (Dunn et al., 2017), ou selon le mode d'allaitement (Ho et al., 2018), le microbiote sera différent du fait d'une exposition bactérienne différente (Huurre et al., 2008). Mais lorsque nous regardons la composition du microbiote à l'âge adulte, celui-ci est très diversifié et possède sa propre signature car de nombreux autres facteurs environnementaux, comme l'alimentation, la prise de médicaments, et aujourd'hui nous le savons depuis peu l'activité physique, vont jouer sur sa composition et sa richesse.

### a) Microbiote et alimentation

L'alimentation apparaît comme l'un des principaux facteurs conditionnant les caractéristiques du microbiote intestinal tout au long de la vie de l'hôte. Les bactéries se nourrissent de leur environnement, du mucus des cellules intestinales, de bactéries mortes ou de résidus alimentaires. Cependant, leur principale source d'énergie demeure les fibres issues de notre alimentation. Il n'est donc pas surprenant que le microbiote intestinal soit conditionné par le régime alimentaire. En effet, dès les premiers jours de vie, le lait maternel riche en oligosaccharides (fibres solubles) permet le développement et la croissance de genre bactériens *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* au niveau du colon (Jost et al., 2015). Une étude ayant mis en jeu 59 espèces différentes de mammifères révèle par exemple un microbiote moins diversifié chez les carnivores par rapport à celui des herbivores, lui-même moins diversifié que celui des omnivores (Ley et al., 2008). Chacun de ces microbiotes serait adapté au régime alimentaire de son hôte avec des communautés microbiennes spécialisées dans la synthèse et/ou la dégradation de protéines et d'acides aminés. Chez l'Humain, c'est avant tout les quantités de fibres et de sucres ingérés qui induisent les différences inter-individus concernant le microbiote intestinal. Des régimes enrichis ou appauvris en fibres et en hydrates de carbone impactent la répartition des populations microbiennes au sein de l'intestin chez l'Homme comme chez le rongeur (Turnbaugh et al., 2009; Walker et al., 2011). Par ailleurs, une étude a montré que les individus sud-américains avaient un microbiote très différent des nord-américains mais relativement similaire à celui d'individus africains (Yatsunenکو et al., 2012). Ceci étant probablement lié aux différences de régimes alimentaires : riches en

hydrates de carbone issus des plantes pour les sud-américains et africains et riches en protéines animales pour les nord-américains. En effet, les régimes riches en fibres ou riches en protéines animales modifient de manière reproductible les proportions relatives de plusieurs bactéries intestinales (David et al., 2014).

Nous voyons au travers de ces quelques études que les fibres alimentaires constituent un élément nutritionnel déterminant pour notre microbiote. Majoritairement issues des céréales, des fruits et des légumes, ces fibres alimentaires sont composées de monosaccharides liés entre eux par des liaisons glycosidiques. Mais notre organisme n'est pas équipé des enzymes permettant de rompre ces liaisons. Ce sont les bactéries intestinales, via leur glycosides hydrolases et des polysaccharides lyases qui dégradent les fibres alimentaires, arrivant intactes dans les parties basses de l'intestin. Les substrats issus de ces dégradations constituent la principale source d'énergie des bactéries du microbiote intestinal (Flint et al., 2012). Ainsi, chez l'homme, un régime riche en fibres alimentaires est associé à une plus grande diversité microbienne au sein de l'intestin, tandis qu'un régime appauvri en fibres est associé à une moins grande diversité (Sonnenburg and Sonnenburg, 2014).

L'impact du régime alimentaire sur la composition du microbiote a été mis en évidence par le consortium de l'étude MetaHIT (Metagenomics of the Human Intestinal Tract) qui a permis de définir 3 grands groupes ou entérotypes, basés par les proportions respectives de 3 genres bactériens dans leur cohorte humaine. Ainsi, les personnes appartenant à l'entérotipe 1 ont un microbiote dominé par le genre *Bacteroides*, l'entérotipe 2 est dominé par le genre *Prevotella* et l'entérotipe 3 est dominé par le genre *Ruminococcus*. Or, de manière intéressante, la répartition des individus dans les 3 entérotypes existants n'était pas en lien avec leur origine géographique, leur sexe, leur âge ou leur état de santé, mais dépendait principalement de leur régime alimentaire. Ainsi, l'entérotipe *Prevotella* serait plus le reflet d'un régime riche en glucides et pauvre en protéines animales, alors que l'entérotipe *Bacteroides* serait associé à un régime riche en viande et en graisses saturées. Il ne reste que l'entérotipe *Ruminococcus* qui n'a pu être associé clairement à un régime alimentaire spécifique (Wu et al., 2011).

La nutrition étant liée au niveau d'activité physique de l'individu (i.e. sédentaire, actif, entraîné), ce lien alimentation/microbiote interroge aussi sur les relations entre microbiote et activité physique, thématique qui a pris de l'ampleur dans cette dernière décennie.

b) Microbiote et Activité Physique

Aujourd'hui, les études s'intéressant à l'influence de l'activité physique sur le microbiote intestinal sont nombreuses (cf. Tableau n°6). Des revues de synthèse et méta-analyses sont apparues dans la littérature et permettent d'en dégager certaines conclusions (Cook et al., 2016; Monda et al., 2017). Tout d'abord, l'effet de l'activité physique et/ou de l'entraînement sur le microbiote intestinal semble toujours controversé, en tout cas très différencié. Son impact sur la composition du microbiote dépend en effet du mode d'exercice physique réalisé (volontaire ou contrôlé) (Allen et al., 2015; Lamoureux et al., 2017), de l'âge de l'individu et du type d'entraînement (cf. Tableau n°6). Nous pouvons aussi souligner la difficulté d'isoler le facteur activité physique du facteur nutrition lors d'études chez l'homme comparant par exemple des athlètes à des groupes sédentaires. C'est le cas par exemple dans l'étude princeps de Clarke et al. (2014) dans laquelle les athlètes présentaient des régimes nutritionnels spécifiques à leur statut de sportif de haut-niveau, et ce depuis de nombreuses années. Si plusieurs études se sont intéressées aux liens entre microbiote et activité physique, très peu ont étudié à l'inverse les liens entre microbiote et hypoactivité.

Tableau n°6 : Activité physique et microbiote intestinal en conditions saines					
Références	Sujets	Modèle	Durée	Paramètres mesurés	Résultats
Matsumoto <i>et al.</i> , 2008	7 rats mâles	Entraînement volontaire dans une roue (VWR)	5 semaines	Diversité bactériennes caecale	"Modification" de la diversité avec l'exercice
Allen <i>et al.</i> , 2015	10 Souris mâles	Entraînement volontaire dans une roue (VWR)	6 semaines	$\alpha$ -diversité	Inférieur par rapport CTL et Entraînement forcé sur tapis (FTR)
				Bacteroidetes / Firmicutes	NS
				Proportion Tenerecutes (%)	$\approx$ +500% vs CTL et FTR
				Proportion Proteobacteria (%)	$\approx$ +300% vs CTL et FTR
	10 souris mâles	Entraînement forcé sur tapis (FTR)	6 semaines	$\alpha$ -diversité	Supérieur à VWR, Non significatif vs CTL
				Bacteroidetes / Firmicutes	Non significatif
				Proportion Tenerecutes (%)	$\approx$ -80% vs VWR, Non significatif vs CTL
				Proportion Proteobacteria (%)	$\approx$ -70% vs VWR, Non significatif vs CTL
Lamoureux, Grandy and Langille, 2017	10 Souris femelles par groupe	Entraînement volontaire dans une roue (VE) + Entraînement forcé sur tapis (FTR)	55 jours pour VE et 6 semaines pour FE	$\beta$ -diversité	Non significatif
				Proportion des phylas	Non significatif
Choi <i>et al.</i> , 2013	6 souris mâles par groupe	Entraînement volontaire dans une roue (VE)	5 semaines	Analyse taxonomique	2510 taxons différaient terme d'abondance entre les souris entre VE et CTL
Queipo-Ortuño <i>et al.</i> , 2013	10 souris mâles par groupe	Entraînement volontaire dans une roue (VE)	6 jours	Analyse taxonomique	Nombreuses différences dans les taxons entre VE et CTL
Kang <i>et al.</i> , 2014	10 souris mâles par groupe	Entraînement 1h par jour à 7m/min, 5 jours par semaine	16 semaines	Analyse taxonomique	Nombreuses variations entre Entraînement et CTL
				Proportion Streptococcus	Non significatif
				Proportion Firmicutes	$\approx$ +17% vs CTL
				Proportion Bacteroidetes	$\approx$ -12% vs CTL
				Proportion Tenericutes	$\approx$ -85% vs CTL
Lambert <i>et al.</i> , 2015	10 souris mâles par groupes	Entraînement 1h par jour à 5m/min, 5 jours par semaine	6 semaines	Abondance Bacteroidetes/Prevotella	Diminution vs CTL
				Abondance Firmicutes	Augmentation vs CTL
Maillard <i>et al.</i> , 2019	12 rats mâles par groupe	Entraînement continu à intensité modérée ou Entraînement intermittent à haute intensité 5 jours par semaine	10 semaines	Composition bactérienne	Les deux types d'entraînement n'ont pas eu d'effet sur la composition bactérienne
McFadzean <i>et al.</i> , 2014	Sujets humains	1493 sujets répartis en 5 groupes en fonction de leur fréquence d'activité physique.	Non renseignée	$\alpha$ -diversité Analyse taxonomique	L'exercice augmente l' $\alpha$ -diversité et modifie les proportions de certains ordres des Firmicutes
Clarke <i>et al.</i> , 2014	Sujets humains	40 Rugbymen de haut-niveau vs 23 individus contrôles	Non renseignée	$\alpha$ -diversité	Plus importante chez les sportifs de haut niveau
Estaki <i>et al.</i> , 2016	Sujets humains	22 hommes et 19 femmes (18-35ans)	Non renseignée	Mesure de VO <sub>2</sub> max $\alpha$ -diversité $\beta$ -diversité	Corrélation positive entre $\dot{V}O_{2max}$ et $\alpha$ -diversité

Tableau n°6 : Impact de l'activité physique sur le microbiote intestinal

c) Microbiote et Hypoactivité

De manière étonnante, mais expliquée par les moyens mis en œuvre, les quelques études qui existent sur cette problématique sont issues principalement du domaine de la recherche spatiale. Dans ce contexte, plusieurs études ont utilisé le modèle de suspension pour analyser l'impact de l'hypoactivité sur le microbiote intestinal. 4 semaines de suspension par la queue chez le rat conduisent ainsi à une augmentation de l'abondance du phylum des *Protéobactéries* avec une croissance de certaines espèces comme les *Escheridia coli* (Yang et al., 2018b). D'autres équipes ont montré que à court et long terme, la suspension par la queue diminue le ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* et augmente la proportion de *Bacteroidetes* gram-négatives responsables en partie de la production de lipopolysaccharides (LPS) et de cytokines pro-inflammatoires comme IL-6 (Jin et al., 2018; Ritchie et al., 2015). Certains expliquent ce phénomène par une augmentation de la translocation de déchets bactériens dans l'iléon (Zhou et al., 2012). Cependant, si l'augmentation de la l'endotoxémie en impesanteur serait due à une plus grande activité des bactéries gram-négatives, des altérations de la barrière intestinale pourraient également jouer un rôle clé. En effet, 28 jours de suspension par la queue chez la souris engendrent une dégradation des cellules épithéliales et une augmentation de la perméabilité intestinale favorable au passage de LPS dans le compartiment sanguin (Shi et al., 2017). Même si l'inflammation ici est systémique, une autre étude montre que la suspension par la queue pendant 3 à 14 jours modifie la proportion microbienne de certaines souches de bactéries à filaments segmentés, connues pour jouer un rôle dans la régulation des processus inflammatoires. Plus spécifiquement, cette modification favorise une inflammation intestinale au niveau du colon avec une diminution de la production colique de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, une augmentation de la production colique de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  ainsi qu'une augmentation de de l'infiltration de neutrophiles dans les colonocytes (Li et al., 2015).

Il est important de souligner que le confinement joue probablement un rôle dans les modifications du microbiote intestinal pouvant s'opérer durant un vol spatial, et ce indépendamment de l'hypoactivité. En effet, les navettes de transport ou l'ISS sont des modules étroits et confinés dans lesquels des individus vivent en vase clos. De telles conditions peuvent influencer la flore microbienne des astronautes (Nefedov et al., 1971). On ne peut donc exclure que des environnements, comme l'ISS, provoquent une normalisation

microbienne de tous les astronautes ayant effectué des missions à son bord. Chaque passager se retrouvant "contaminé" par le lieu et ses occupants à son arrivée et "contaminerait" à son tour les lieux et les nouveaux arrivants avant de partir, tel un héritage bactérien que l'on se transmettrait de génération d'astronautes en génération d'astronautes au sein de cette station.

Le manque d'étude questionnant l'impact de l'hypoactivité et de l'impesanteur sur le microbiote intestinal est réel puisqu'à ce jour, à notre connaissance, aucune étude n'a clairement ciblé le séquençage bactérien intestinal lors de vols spatiaux chez l'homme et l'animal ou lors de protocole d'hypoactivité sur Terre comme le bedrest ou l'immersion sèche.

d) Microbiote et dialogue inter-organes : de l'eubiose à la dysbiose.

Nous avons vu précédemment que la composition de notre microbiote intestinal dépend de facteurs environnementaux. Il faut souligner ici que le microbiote intestinal et donc les bactéries vivent en symbiose avec l'hôte, chacun tirant bénéfice de la présence de l'autre. Le microbiote intestinal joue un rôle essentiel dans la santé de l'hôte, notamment via la production des vitamines ou encore l'immunité (Clemente et al., 2012; Sekirov et al., 2010). De plus, par son alimentation, l'hôte apporte différents substrats permettant le développement et le maintien de sa communauté bactérienne. Cet état d'équilibre du microbiote intestinal associé à un bon état de santé est appelé eubiose. Lorsque cet équilibre est rompu, des dérégulations ou des appauvrissements des populations bactériennes intestinales apparaissent, on parle alors de dysbiose. Ces phénomènes ont des conséquences physiopathologiques sur l'organisme car il existe de véritables dialogues entre notre microbiote et d'autres organes ou tissus comme le cerveau, le tissu adipeux ou encore les poumons. Ces communications inter-organes sont telles qu'aujourd'hui, l'implication du microbiote intestinal est envisagée dans de nombreuses pathologies comme des maladies impactant le système nerveux (e.g. autisme), la dépression ainsi que des maladies inflammatoires (e.g. maladie de Crohn, stéatose hépatique) et/ou métaboliques (e.g. obésité et/ou diabète de type 2) (Sekirov et al., 2010).

Ces dialogues inter-organes et l'importance *in-vivo* du microbiote intestinal dans la santé de l'hôte a pu être mis en évidence par 2 approches expérimentales complémentaires. La première approche est l'utilisation de souris dépourvues de microbiote depuis la naissance, appelées axéniques (ou *germ free* en anglais). Ces animaux sont issus de lignées élevées dans

des conditions parfaitement stériles sur plusieurs générations, ils sont donc complètement dépourvus de micro-organismes que ce soit sur eux ou en eux. Ceci permet d'analyser l'impact de l'absence totale de bactéries intestinales sur l'organisme. De plus, ce modèle est également très utile pour étudier l'impact des colonisations bactériennes spécifiques et contrôlées sur l'hôte (Hansen et al., 2012; Turnbaugh et al., 2006). Cependant, il nécessite une gestion irréprochable de la stérilité tout au long des protocoles expérimentaux. De plus, ce modèle demeure très drastique en raison de l'absence de bactéries intestinales depuis la naissance sur plusieurs générations. En parallèle des souris axéniques, les traitements antibiotiques constituent une approche expérimentale complémentaire, plus accessible et proche de la réalité physiologique chez l'homme (Kennedy et al., 2018). Grâce à ce modèle, il devient facile d'induire une déplétion de la flore intestinale, d'en contrôler l'amplitude (totale, large spectre ou partielle selon les antibiotiques choisis) et la durée (quelques jours à plusieurs mois) afin d'en étudier l'impact sur les organes de l'hôte. De plus, il est aisé d'étudier avec ce modèle l'impact de la recolonisation bactérienne naturelle ou forcée, via respectivement la réexposition à l'environnement bactérien normal ou le gavage de suspensions bactériennes

## **B. Microbiote intestinal et muscle squelettique : un nouveau dialogue et les mécanismes envisagés**

### **1) L'émergence d'un axe microbiote-muscle**

La publication de nombreux travaux soulignant le rôle du microbiote intestinal dans de nombreuses pathologies et le métabolisme énergétique a conduit récemment la communauté scientifique à questionner l'hypothèse d'un axe microbiote - muscle squelettique au sein de notre organisme.

Certaines données récemment publiées suggèrent que le microbiote intestinal joue un rôle clé dans les processus de régulation de la masse et de la performance du muscle strié squelettique. Bindels et al. furent ainsi les premiers à montrer chez la souris que le microbiote intestinal est altéré en cas de leucémie aigüe et que la restauration de la flore à l'aide d'une souche de *Lactobacillus* permet de limiter la cachexie musculaire induite par la maladie (Bindels et al., 2012). Par la suite, cette même équipe et d'autres équipes de recherche ont identifié sur le même modèle un effet préventif d'une supplémentation en prébiotique et en probiotique sur la progression cancéreuse et la cachexie associée (Bindels et al., 2015; Varian et al., 2016). Chez l'humain, ce type de supplémentation réduirait également les dommages

musculaires et permettrait une meilleure récupération après un exercice physique (Jäger et al., 2016). En transplantant la flore intestinale issue de cochons obèses à des souris axéniques, Yan et al. observent de leur côté que ces souris répliquent les caractéristiques typologiques et le métabolisme lipidique du muscle squelettique de leur donneur (Yan et al., 2016). L'ensemble de ces études souligne que le microbiote intestinal constituerait un acteur potentiel de la régulation structurelle et métabolique du muscle squelettique. Si les mécanismes sous-jacents demeurent encore mal identifiés, les cytokines pro-inflammatoires, les acides gras à chaîne courte (AGCC), les acides aminés à chaînes ramifiées ainsi que la biodisponibilité des substrats énergétiques constituent de potentiels acteurs à l'origine des interactions entre le microbiote intestinal et le muscle squelettique.

## 2) Hypothèses des mécanismes de l'axe microbiote-muscle

### a) Endotoxémie / inflammation

L'épithélium intestinal fait office de barrière contrôlant la diffusion de LPS de la lumière intestinale vers le compartiment sanguin. Cependant, des événements endogènes ou exogènes peuvent altérer cette fonction et augmenter le passage de LPS dans le sang. Dans ce contexte, le LPS se fixe alors sur le complexe récepteur CD14/TLR4 des macrophages et engendre la synthèse et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Delzenne and Cani, 2008). Des études utilisant des régimes hypercaloriques et hyperlipidémiques (high fat diet ou HFD en anglais) chez la souris ont montré que les altérations du microbiote intestinal induites par ce type d'alimentation sont associées à des désordres pro-inflammatoires systémiques (Cani et al., 2008; Everard et al., 2011). De plus, soumis au même régime HFD, des souris axéniques sont moins sujettes que leurs homologues conventionnelles à l'augmentation de certains marqueurs pro-inflammatoires sanguins tels que IL-1 $\beta$ , IL-6 et le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Rabot et al., 2010).

Les concentrations sanguines en marqueurs pro-inflammatoires tels que TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-1 $\beta$  augmentent en situation d'endotoxémie. Ces cytokines favorisent la phosphorylation du résidu sérine d'IRS-1, ce qui inhibe la sensibilité à l'insuline des cellules (Tilg and Moschen, 2008). En déplétant la flore intestinale avec de la norfloxacine et de l'ampicilline, Membrez et al. montrent que cette prise d'antibiotiques est associée à une meilleure tolérance au glucose chez des souris obèses, et ce notamment en réduisant l'endotoxémie et la production de TNF- $\alpha$  dans le jéjunum (Membrez et al., 2008). En s'appuyant sur différents traitements

d'antibiotiques chez des souris obèses, l'équipe du Pr. Cani confirme ces résultats en observant une diminution des concentrations circulantes en LPS ainsi que de la sécrétion de TNF- $\alpha$  par le tissu adipeux. De manière intéressante, ces résultats sont associés à une augmentation de l'expression de la zonuline-1 (ZO-1) dans l'intestin, suggérant une diminution de la perméabilité intestinale (Cani et al., 2008). Avec le même type d'approche expérimentale, Hwang et al. observent cependant que la déplétion du microbiote intestinal par antibiotique limite l'insulino-résistance, sans nécessairement prévenir l'endotoxémie et l'inflammation associées à un régime HFD. Parallèlement, ils reportent une augmentation de la sécrétion du glucagon like peptide-1 (GLP-1). Sachant que cette hormone intestinale améliore la sensibilité à l'insuline des tissus (Pols et al., 2010). Cette étude suggère que le microbiote intestinal joue un rôle dans la sensibilité à l'insuline, et ce indépendamment de l'endotoxémie ou de l'inflammation (Hwang et al., 2015). Toutes ces études supportent donc le fait que le microbiote intestinal joue un rôle clé dans l'insulino-sensibilité à travers des mécanismes dépendants et indépendants du tissu adipeux et du statut inflammatoire de l'hôte. Cependant des études complémentaires sont encore nécessaires pour identifier les mécanismes mis en jeu.

L'inflammation systémique est aussi identifiée pour stimuler le catabolisme protéique et altérer la réponse anabolique dans le muscle squelettique (Costamagna et al., 2015). En effet, un certain nombre d'études souligne que l'augmentation des concentrations circulantes de TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  est associée à une altération de l'anabolisme musculaire (Crossland et al., 2008; Frost and Lang, 2008). De plus, Haddad et al. montrent qu'IL-6 agit directement sur l'atrophie musculaire via l'inhibition de l'activité de la voie AKT/mTOR (Haddad et al., 2005). Enfin, l'inflammation, et plus particulièrement le TNF- $\alpha$ , agit aussi directement sur les propriétés d'excitabilité du muscle en dérégulant l'activité des canaux sodiques dépendant des motoneurones (Guillouet et al., 2011).

L'ensemble de ces travaux souligne donc que le microbiote intestinal en favorisant un état inflammatoire systémique et l'endotoxémie peut conduire directement et indirectement à altérer la fonction musculaire en dérégulant la sensibilité à l'insuline et le turnover protéique.

*b) Acides gras à chaîne courte (AGCC)*

Grâce au *Lactobacillus*, les hydrates de carbone non-digestibles subissent une fermentation les transformant ainsi en acides gras à chaîne courte (AGCC). Les principaux AGCC formés sont le butyrate, l'acétate et le propionate. Ils font office de source d'énergie pour les cellules épithéliales du colon ou colonocytes (Cummings et al., 1987). Par ailleurs, les AGCC permettent de réduire la perméabilité intestinale en augmentant la production de mucus et en régulant la synthèse des protéines de jonctions serrées (i.e. zonuline et occludine) (Peng et al., 2007). Les AGCC constituent également des ligands pour les récepteurs couplés à la protéine G 41 et 43 (GPR41 et GPR43, respectivement). En se liant sur ces récepteurs des entérocytes, les AGCC activent un signal intracellulaire permettant la sécrétion d'hormones gastro-intestinales (ou incrétines) : le Glucagon Like Peptide-1 (GLP-1) et le Peptide YY (PYY). GLP-1 est impliqué dans la régulation de la satiété, tandis que PYY permet une meilleure motilité du tube digestif et par conséquent une meilleure absorption intestinale (De Silva and Bloom, 2012). Il a été montré que des souris déficientes en GPR41 étaient résistantes à l'obésité, tandis que des souris déficientes en GPR43 présentent un phénotype obèse (Kimura et al., 2013; Samuel et al., 2008). Il semblerait que les AGCC dans le compartiment sanguin aient une fonction anti-inflammatoire en inhibant l'activation du nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) via l'activation de GPR41 et GPR43 au sein des cellules immunitaires (Al-Lahham et al., 2010; Fukae et al., 2005; Maslowski et al., 2009). Ainsi, si la production d'AGCC par le microbiote intestinal est réduite, le statut inflammatoire de l'hôte se modifie à cause d'un défaut d'activation des GPR et/ou par un passage accru de LPS à travers une barrière intestinale plus perméable (Cani et al., 2008). Ainsi, toutes ces données suggèrent qu'une dysbiose intestinale favorise un état inflammatoire de bas grade en raison de la diminution de la production d'AGCC. Comme évoqué dans la partie précédente, ce mécanisme conduirait à une insulino-résistance et une altération du turnover protéique au sein du muscle squelettique.

En diffusant de l'intestin vers le compartiment sanguin via les transporteurs des monocarboxylates (MCT1/4/5 et SMCT1), les AGCC semblent moduler le métabolisme énergétique de différents organes (den Besten et al., 2013). L'équipe de Yamashita montre qu'une supplémentation en acétate chez des souris saines augmente directement l'activation de l'AMPK au sein du muscle squelettique (Yamashita et al., 2009). Or, l'AMPK est connu pour activer PGC-1 $\alpha$ , un régulateur indispensable à la transcription de nombreux gènes impliqués

dans la biogénèse mitochondriale et l'oxydation des acides gras (Jäger et al., 2007). De plus, chez des souris soumises au régime HFD, la supplémentation en butyrate est associée à une meilleure insulino-sensibilité, une augmentation de l'activité d'AMPK et de PGC-1 $\alpha$  et à une augmentation de la proportion de fibres oxydatives de type I dans le muscle squelettique (Gao et al., 2009). Ces données supportent donc le fait que les AGCC modulent positivement l'activité oxydative du muscle squelettique

c) Acides Aminés à Chaînes Ramifiées (AACR)

Les acides aminés à chaînes ramifiées (AACR) comprenant la leucine, l'isoleucine et la valine appartiennent au groupe des acides aminés essentiels. Les bactéries intestinales jouent un rôle important dans le métabolisme des acides aminés. En effet, les souris axéniques présentent une distribution des acides aminés libres dans le tractus intestinal différente de celle des souris conventionnelles (Whitt and Demoss, 1975). Tout au long du tube digestif, les protéases et les peptidases dérivées des bactéries et de leur hôte hydrolysent les protéines et les transforment en peptides puis en acides aminés qui sont utilisés à leur tour par les bactéries et l'hôte (Macfarlane et al., 1989). La fermentation des acides aminés est principalement réalisée par le cluster des *Clostridium*, des *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* ainsi que des *Protéobactéries* (Dai et al., 2011).

Un régime riche en AACR exerce des effets positifs sur la masse corporelle, la synthèse protéique musculaire et l'homéostasie glucidique. En effet, les AACR augmentent le relargage de GLP-1 depuis le tractus intestinal (Chen and Reimer, 2009). De plus, les AACR stimulent la voie Akt/mTOR dans le muscle squelettique permettant une meilleure translation des ARNm et une meilleure synthèse protéique (Kimball and Jefferson, 2004; Vary and Lynch, 2007). Par ailleurs, il a été montré que l'activation de cette voie de signalisation via une supplémentation en leucine prévient l'atrophie musculaire en réduisant la protéolyse et l'autophagie (Dodd and Tee, 2012). Enfin, la supplémentation sur 3 mois en AACR préserve la taille des fibres musculaires et améliore les performances en endurance chez des souris (D'Antona et al., 2010).

Il ne fait donc aucun doute que les études citées dans le paragraphe précédent aient permis la démocratisation de la supplémentation en acides aminés à chaînes ramifiées chez les sportifs et les personnes voulant prévenir et/ou limiter des altérations structurelles et métaboliques musculaires. Cependant, des limites existent pour ce type d'approche car des

études récentes montrent que les AACR favorisent visiblement l'insulino-résistance. En effet, Ridaura et al., montrent que les concentrations sériques en AACR augmentent chez des souris ayant subi une transfection microbienne de personnes insulino-résistantes (Ridaura et al., 2013). En s'appuyant sur une cohorte d'individus diabétiques et en bonne santé, Pedersen et al. montrent dans le même sens que plus les concentrations sériques en AACR sont élevées, plus le risque de présenter un état d'insulino-résistance est important. Dans cette même étude, 4 espèces de bactéries sont identifiées comme jouant un rôle dans l'interaction entre AACR et insulino-sensibilité : *Prevotella copri* et *Bacteroides vulgatus* associées à la biosynthèse des AACR et *Butyrivibrio crossotus* et *Eubacterium siraeum* impliquées quant à elle dans leur utilisation (Pedersen et al., 2016). L'étude de Tremblay et al. montre par ailleurs que des concentrations sanguines élevées en AACR maintiennent l'activation de la voie AKT/mTOR, ce qui induirait un rétrocontrôle négatif sur le récepteur à l'insuline (IRS-1) dans les organes insulino-sensibles (Tremblay et al., 2005). Dans le même sens, la réduction de la biodisponibilité en leucine améliore l'insulino-sensibilité chez la souris en limitant l'activité anabolique dans le foie et le muscle (Xiao et al., 2011). Ainsi, même si l'interaction microbiote-muscle via les AACR demande à être mieux caractérisée, ces données soulignent que le microbiote intestinal peut moduler le muscle squelettique en agissant sur la biodisponibilité de ces derniers dans l'organisme.

#### d) Absorption du glucose

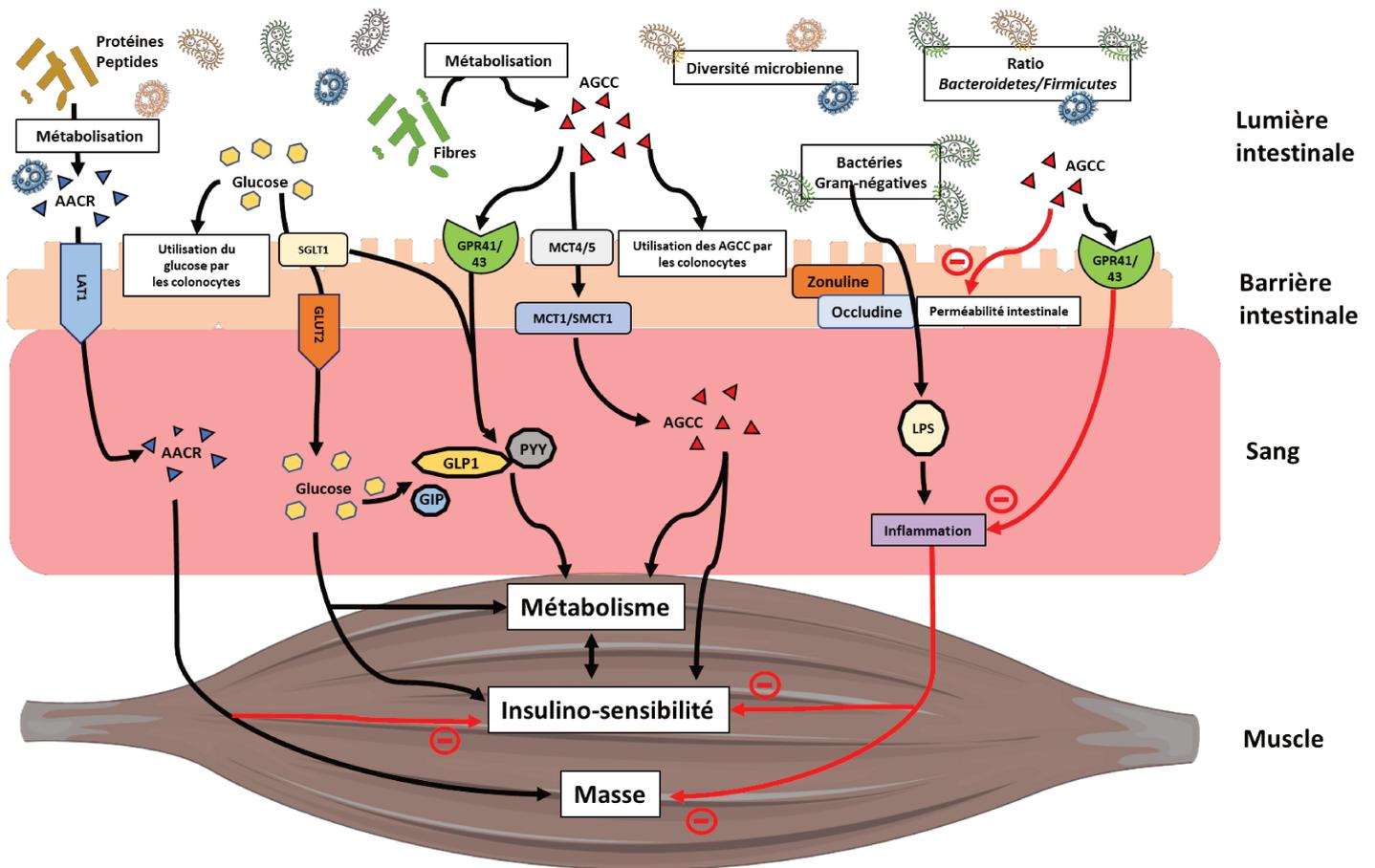
Les hydrates de carbone, ou glucides, sont des substrats énergétiques clés pour le muscle squelettique. Ce dernier produit en effet de l'ATP à partir de la dégradation d'un monosaccharide appelé glucose. L'absorption intestinale du glucose est médiée par les entérocytes via le co-transporteur sodium glucose (SGLT1) au pôle apical, tandis que le transporteur de glucose de type 2 (GLUT2) assure sa sortie vers le compartiment sanguin au niveau de la membrane basolatérale. De plus, SGLT1 régule également la sécrétion des incrétines GLP-1 et GIP en réponse au passage du glucose permettant ainsi d'optimiser l'absorption de glucose aux besoins de l'organisme (Röder et al., 2014). De manière intéressante, Zarrinpar et al. montrent que la déplétion du microbiote intestinal par traitement antibiotique induit une meilleure insulino-sensibilité de l'hôte. Ces chercheurs expliquent ce résultat positif par le fait que la diminution de la population de *Firmicutes* diminue directement la production des AGCC. Ces derniers, et plus particulièrement le

butyrate, sont en effet utilisés par les entérocytes comme source d'énergie. En absence d'AGCC, ces chercheurs observent une augmentation de l'activité de la glycolyse anaérobie au niveau des colonocytes des souris traitées par antibiotiques. Ces données soulignent donc que la déplétion du microbiote intestinal diminuerait la part de glucose absorbé par l'organisme en faveur des besoins énergétiques des cellules intestinales, contribuant par conséquent à améliorer l'insulino-sensibilité globale de l'hôte (Zarrinpar et al., 2018).

De plus, comme nous l'avons vu précédemment, le microbiote intestinal peut contribuer au développement d'un état pro-inflammatoire. Or, l'inflammation altère l'absorption intestinale des glucides simples. En effet, en réponse à une injection intraveineuse de TNF- $\alpha$ , l'absorption intestinale en D-fructose se retrouve inhibée par une inactivation des transporteurs de glucose de type 5 (GLUT5) au niveau de la membrane apicale des entérocytes (Lang et al., 1993). Une telle injection diminue aussi l'absorption de D-Galactose à travers cette même membrane en inhibant cette fois les transporteurs SGLT1 (Amador et al., 2007). Ces études suggèrent donc que l'état inflammatoire associé à une dysbiose pourrait limiter l'absorption de différents types de glucides simples, et par conséquent affecter l'homéostasie glucidique de l'organisme, et probablement du muscle squelettique.

**En résumé :** Le microbiote intestinal représente les bactéries ayant colonisé le tractus digestif. Ce microbiote est différent pour chaque individu, il s'acquiert à la naissance et évolue en fonction du comportement, de l'environnement et de l'alimentation de l'hôte. Il est aujourd'hui considéré comme un organe jouant un rôle important dans tout l'organisme et est impliqué en cas de dysbiose dans un très grand nombre de pathologies. Récemment, l'hypothèse d'un dialogue entre le microbiote intestinal et muscle squelettique a émergé. En effet, dans certaines conditions pathologiques, le microbiote intestinal apparaît jouer un rôle dans la perte de masse et de la fonction musculaire. Cependant, les mécanismes physiologiques sous-jacents restent encore peu étudiés. Enfin, l'activité et/ou l'hypoactivité pourrait jouer un rôle dans la composition microbienne de l'intestin, ouvrant ainsi un nouveau pan de recherche sur les méfaits de l'hypoactivité sur le muscle squelettique à travers un nouvel acteur : le microbiote intestinal.

## Illustration n°9 : Proposition de mécanismes moléculaires de l'axe microbiote intestinal-muscle squelettique



Les principaux mécanismes qui pourraient lier le microbiote intestinal et le muscle squelettique sont :

1. **L'endotoxémie et l'inflammation** : quand la perméabilité intestinale est altérée, les lipopolysaccharides (LPS) provenant de la membrane externe des bactéries gram-négatives diffusent de manière plus importante dans le compartiment sanguin augmentant ainsi l'endotoxémie. Ce phénomène est associé à une hausse de l'inflammation systémique qui est connue pour altérer l'insulino-sensibilité et la masse musculaire.
2. **Les Acides Gras à Chaîne Courte (AGCC)** : issus de la fermentation des fibres, les AGCC sont une source d'énergie pour les colonocytes. Ils permettent aussi de réduire la perméabilité intestinale en modulant l'activité des protéines de jonctions serrées (i.e. zonuline et occludine). De plus, ils servent de ligands pour leur Récepteurs Couplés à la G-Protéine (i.e. GPR41 et GPR43) permettant de limiter l'inflammation systémique et d'augmenter la sécrétion d'hormones gastro-intestinales comme le Glucagon Like Peptide 1 (GLP-1) et le peptide YY (PYY). Ces derniers régulent la satiété, l'absorption intestinale et l'insulino-sensibilité. Enfin, les AGCC peuvent diffuser au niveau systémique via différents transporteurs et impacter de manière positive le métabolisme oxydatif et l'insulino-sensibilité.
3. **Les Acides Aminés à Chaines Ramifiées (AACR)** : issus de la transformation des protéines et des peptides par certaines espèces de bactéries intestinales, les AACR passent de la lumière intestinale au compartiment sanguin via leur transporteur LAT1. Ils sont connus pour limiter l'atrophie. Cependant, des études récentes montrent qu'ils seraient aussi responsables d'une diminution de l'insulino-sensibilité.
4. **L'absorption du glucose** : Issu de l'alimentation, le glucose peut servir de substrat énergétique aux colonocytes, mais est surtout transporté dans le compartiment sanguin grâce à ses transporteurs : le co-transporteur sodium-glucose 1 (SGLT1) et le transporteur du glucose, GLUT-2. La quantité de glucose passant dans le compartiment sanguin influence sur le métabolisme et l'insulino-sensibilité de l'hôte. De plus, l'activité de SGLT1 module la sécrétion d'incrétines comme GLP-1 ou le Peptide Insulino-trope Dépendant du Glucose (GIP) qui régulent l'insulino-sensibilité.



## OBJECTIFS DE THESE

L'hypoactivité se caractérise par une absence quasi-totale d'activité musculaire et de contraintes sur l'appareil musculo-squelettique. Certaines personnes y font face dans des situations très particulières d'immobilisation comme lors d'un plâtre ou d'un alitement prolongé en cas d'hospitalisation. Par ailleurs, les astronautes sont aussi confrontés à l'hypoactivité durant les vols spatiaux. Cette hypoactivité génère de nombreuses altérations physiologiques au niveau de différents organes. Parmi eux, le muscle squelettique est l'un des plus impactés. En effet, on y observe une perte de masse, ainsi que des modifications du phénotype contractile et métabolique. Les mécanismes sous-jacents sont très étudiés depuis des décennies par la communauté scientifique afin de développer des traitements médicaux ou des contre-mesures adaptés et efficaces. Parmi les différents mécanismes impliqués, l'exploration du métabolisme du fer et du microbiote intestinal constitue une approche nouvelle pour mieux appréhender ces enjeux sanitaires, d'autant que ces deux cibles présentent des interactions potentielles avec le muscle squelettique.

**Dans ce contexte, ce travail de thèse a eu pour objectif, en utilisant différents modèles d'hypoactivité, de déterminer chez le rongeur et chez l'homme l'impact de l'hypoactivité sur le métabolisme du fer et le microbiote intestinal et d'en étudier les mécanismes sous-jacents avec une attention particulière sur le rôle du muscle squelettique dans ces mécanismes. Nos travaux de recherche se sont plus particulièrement intéressés au rôle joué par le muscle squelettique dans les modifications du métabolisme du fer et du microbiote intestinal, mais également à l'inverse sur les conséquences de ces changements sur la structure et le métabolisme du muscle.**

Ainsi, les 3 études relatives à ce travail de thèse ont été réalisées afin de :

**1. Déterminer l'impact de l'hypoactivité sur le métabolisme du fer et les mécanismes sous-jacents le régulant chez des rats suspendus par la queue pendant 7 jours.** Nous faisons l'hypothèse que l'altération du métabolisme du fer en condition d'impesance serait due à une élévation de la transcription d'hepcidine, elle-même déclenchée par l'inflammation de bas grade associée à cette condition (Etude 1)

**2. Déterminer si le muscle squelettique joue un rôle dans la redistribution du fer observée en hypoactivité en s'appuyant sur un protocole de reconditionnement intermittent chez le rongeur.** Nous émettons l'hypothèse que limiter l'atrophie musculaire sera associé à une modulation de la synthèse d'hépcidine, et par conséquent limitera la réduction de la biodisponibilité en fer et le stockage tissulaire (Etude 2)

**3. . Déterminer l'impact du microbiote intestinal sur le tissu musculaire tant au niveau structurel que fonctionnel.** Nous faisons l'hypothèse qu'une modulation du microbiote intestinal impactera à la fois la structure et la fonction du muscle squelettique (Etude 3)

Les publications en lien avec ce travail de doctorat sont listées ci-dessous. En raison d'un décalage de l'expérimentation utilisant l'immersion sèche chez l'homme, les données en lien avec cette étude sont intégrées dans la partie Discussion et Perspectives. Seules les publications indiquées par un astérisque, car au cœur de la problématique de thèse, sont présentées dans la partie Etudes-Contributions Personnelles de ce document.

## LISTES DES PUBLICATIONS

### I. Articles publiés dans des revues avec comité de lecture

#### **\* Publications présentées dans ce travail de thèse**

1- Kenawi M, Rouger E, Island ML, Leroyer P, Robin F, Remy S, Anegon I, **Nay K**, Derbré F, Brissot P, Ropert M, Cavey T, Loréal O. Ceruloplasmin deficiency does not induce macrophagic iron overload: lessons from a new rat model of hereditary aceruloplasminemia. Accepted dans The FASEB Journal le 26 août 2019. (IF=5,4)

**\*2-Nay K**, Jollet M, Goustard B, Baati N, Vernus B, Pontones M, Lefevre-Orfila L, Bendavid C, Rué O, Mariadassou M, Bonnieu A, Ollendorff V, Lepage P, Derbré F & Koechlin-Ramonatxo C (2019). *Gut bacteria are critical for optimal muscle function: a potential link with glucose homeostasis*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism; DOI: 10.1152/ajpendo.00521.2018. (IF=4,1)

3-Appriou Z, **Nay K**, Pierre N, Saligaut D, Lefevre-Orfila L, Martin B, Cavey T, Ropert M, Loréal O, Rannou-Bekono F, Derbré F. *Skeletal muscle ceramides do not contribute to physical inactivity-induced insulin resistance*. Appl Physiol Nutr Metab. doi: 10.1139/apnm-2018-0850. 2019. (IF=3,4)

4-Arena G, Cissé MY, Pyrdziak S, Chatre L, Riscal R, Fuentes M, Arnold JJ, Kastner M, Gayte L, Bertrand-Gaday C, **Nay K**, Angebault-Prouteau C, Murray K, Chabi B, Koechlin-Ramonatxo C, Orsetti B, Vincent C, Casas F, Marine J-C, Etienne-Manneville S, Bernex F, Lombès A, Cameron CE, Dubouchaud H, Ricchetti M, Linares LK, Le Cam L. *Mitochondrial MDM2 Regulates Respiratory Complex I Activity Independently of p53*. Mol Cell 69: 594-609.e8, 2018. (IF=14,5)

**\*5-Cavey T**, Pierre N, **Nay K**, Allain C, Ropert M, Loréal O, Derbré F. *Simulated microgravity decreases circulating iron in rats: role of inflammation-induced hepcidin upregulation*. Exp Physiol 102: 291–298, 2017. (IF=2,6)

### II. Articles soumis dans des revues avec comité de lecture

#### **\* Publications présentées dans ce travail de thèse**

**\*1-Nay K**, Martin DJ, Orfila L, Saligaut D, Martin B, Horeau M, Cavey T, Kenawi M, Island ML, Ropert M, Loréal O, Koechlin-Ramonatxo C, Derbré F. *Intermittent reloading prevents microgravity-induced muscle atrophy, but not iron misdistribution*. Soumis dans American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology (IF=3,1)

2-Perrin T, Faure C, **Nay K**, Cattozzo G, Sorel A, Kerhervé H, Bideau B, Kulpa R. *Paving the way to exergaming: lessons from physiological assessment during virtual reality gaming*. En révision majeur dans SPORT. (IF=pas encore impacté)

### III. Présentations orales lors de congrès nationaux et internationaux

1. **Nay K**, Jollet M, Goustard B, Baati N, Vernus B, Bonnieu A, Ollendorff V, Lepage P, Derbré F, Koechlin-Ramonatxo C. (2018) *Gut microbiota dysbiosis induced by antibiotic treatment and reseeded : functional and metabolic impacts on skeletal muscle*. 23rd Annual Congress of the European College of Sport Science; Dublin, Ireland, 4th-7th July 2018.
2. **Nay K**, Pierre N, Cavey T, Allain C, Ropert M, Loréal O, Koechlin-Ramonatxo C, Derbré F. (2017) *La biodisponibilité du fer est affectée par la microgravité chez le rat*. 17th Congress of the Association des Chercheurs en Activités Physique et Sportives (ACAPS); Dijon, France, 29<sup>th</sup>-31<sup>st</sup> October 2017
3. **Nay K**, Jollet M, Goustard B, Baati N, Vernus B, Bonnieu A, Ollendorff V, Lepage P, Derbré F, Koechlin-Ramonatxo C. (2017) *Modulation of skeletal muscle function by gut microbiota dysbiosis and reseeded*. 5th World Congress on Targeting Microbiota; Berlin, Germany, 26<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> October 2017

Ne sont pas mentionnés ici les communications orales non-présentées par le doctorant et les communications par poster.

## **ETUDES-CONTRIBUTIONS PERSONNELLES**

## **Avant-Propos**

Chaque étude est introduite par un résumé en français suivi du tiré-à-part exhaustif en anglais de la publication. Des annexes méthodologiques communes sont présentées en fin de manuscrit pour apporter des informations complémentaires sur certains protocoles et méthodes spécifiques.

# **I. Etude n°1 : L'hypoactivité diminue la biodisponibilité du fer chez le rat : rôle de l'inflammation dans la surexpression d'hepcidine.**

## **Introduction :**

Dans un futur proche, le nombre et la durée des vols spatiaux habités augmenteront inexorablement. Les agences spatiales planifient actuellement des voyages vers la Lune, vers des astéroïdes ou même vers Mars tandis que des entreprises privées comme Space X développent un tourisme de l'espace. Dans un tel contexte, l'exploration des différents effets de l'hypoactivité associés à l'impesanteur sur la santé des astronautes constitue un enjeu majeur. Au-delà de la perte de masse osseuse et de masse musculaire désormais bien caractérisées (Hargens and Vico, 2016), des études récentes ont mis en évidence que le métabolisme du fer est aussi affecté en impesanteur (Zwart et al., 2013).

Le fer joue un rôle clé dans un grand nombre de fonctions biologiques comme le transport d'oxygène, les réactions enzymatiques et la production d'énergie. Le corps humain contient entre 3 et 5 g de fer. 65 à 75% de ce fer est contenu dans l'hémoglobine, 10 à 20% sont stockés dans le foie sous forme de ferritine. 10% se trouvent dans la myoglobine du muscle strié squelettique (Zhang, 2010), tandis que le reste est réparti dans différents compartiments cellulaires. La microgravité est reconnue chez l'homme pour diminuer les concentrations en fer et transferrine circulantes (Smith et al., 2005; Zwart et al., 2013). De plus, une augmentation de la ferritine plasmatique est constatée chez les astronautes séjournant dans la station spatiale internationale (ISS) supportant une augmentation du stockage tissulaire en fer (Zwart et al., 2013). Ce stockage tissulaire anormal pourrait jouer un rôle clé dans l'atrophie musculaire et l'ostéoporose associée à l'hypoactivité, mais également déréguler le système immunitaire et augmenter la sensibilité aux radiations (Reardon and Allen, 2009; Tsay et al., 2010). D'autre part, une réduction du fer biodisponible est

généralement associée à une réduction du transport de l'oxygène dans l'organisme, phénomène bien identifié chez l'astronaute dans plusieurs missions spatiales et connu sous le nom « d'anémie du vol spatial » (Tavassoli, 1982). Si ces modifications physiologiques sont aujourd'hui bien décrites, les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont cependant pas identifiés.

Le métabolisme du fer est principalement contrôlé par l'hepcidine, un peptide de 25 acides aminés sécrété par le foie qui réduit l'export de fer cellulaire des entérocytes et des macrophages vers la circulation sanguine en dégradant une protéine d'export membranaire appelée ferroportine (Zhang, 2010). Par conséquent, une augmentation du niveau d'hepcidine est associée à une réduction de la biodisponibilité en fer plasmatique et à une séquestration accrue du fer dans les cellules exprimant la ferroportine, notamment les macrophages (Ganz, 2011).

L'objectif de cette première étude est donc de déterminer chez le rat, l'impact de l'hypoactivité sur le métabolisme du fer et les mécanismes le régulant, en utilisant le modèle de suspension par la queue pendant 7 jours. Nous faisons l'hypothèse que les altérations du métabolisme du fer en condition d'impesanteur seraient dues à une élévation de la transcription d'hepcidine elle-même déclenchée par l'inflammation de bas grade qui est associée à cette condition.

#### **Matériel et méthodes :**

Pour répondre à cette hypothèse, nous utilisons un modèle de suspension par la queue (Fiche méthodologique n°1, page n°184) qui est le plus fréquemment utilisé pour simuler l'absence de pesanteur (Morey-Holton and Globus, 2002). Ainsi, 16 rats Wistar mâles sont répartis en 2 groupes expérimentaux : Contrôle (CTL, n=8) et Suspendu (HU, n=8). Après 7 jours de suspension, les rats sont sacrifiés et le sang prélevé par ponction intracardiaque puis centrifugé afin d'en extraire le sérum. Le foie, la rate et le muscle gastrocnémien sont prélevés, pesés puis congelés à -80°C dans l'attente d'analyses.

#### **Résultats :**

Après 7 jours de suspension, le groupe HU présente une transcription hépatique d'hepcidine plus importante que le groupe CTL (+74%, p=0,001). En accord avec les propriétés biologiques de cette hormone, le stockage en fer est plus important chez le groupe HU au

niveau de la rate (+78%,  $p=0,030$ ), mais pas du foie. Nous notons aussi une diminution des concentrations sériques en fer (-35%,  $p=0,002$ ) ainsi qu'une diminution de la saturation en transferrine (-25%,  $p=0,011$ ) par rapport au groupe CTL supportant une réduction de la biodisponibilité en fer. Afin de comprendre par quels mécanismes la transcription d'hepcidine est augmentée en réponse à l'hypoactivité, nous avons étudié par Western blot les voies de signalisation impliquées dans sa régulation. Nous avons trouvé que seule la voie IL-6/STAT3 est suractivée chez le groupe HU (+193%,  $p<0,001$ ). Cette voie, sensible à l'inflammation est aussi associée à la transcription du gène de l'haptoglobine. Pour confirmer l'activation de la voie IL-6/STAT3, nous avons analysé la transcription hépatique d'haptoglobine, cette dernière est augmentée chez les HU (+167%,  $p<0,001$ ) confirmant l'implication de la voie de l'inflammation dans la dérégulation de la transcription hépatique d'hepcidine et dans les dérégulations du métabolisme du fer en hypoactivité. L'origine de cet état pro-inflammatoire pourrait être le muscle atrophié. En effet, chez les rats suspendus, nous notons au niveau du muscle gastrocnémien une perte significative de sa masse (-12%,  $p=0,010$ ) associée à une augmentation de la transcription d'IL-6 (+135%,  $p=0,028$ ), alors que d'autres organes comme le foie et la rate ne présentent aucune variation significative de cette transcription.

#### Conclusion :

Ces résultats que l'hypoactivité induit une redistribution du fer dans l'organisme et plus spécifiquement que la rate, un organe riche en macrophages, est surchargée en fer après 7 jours de suspension par la queue. Ils soulignent que ces dérégulations sont associées à une augmentation de la transcription hépatique du régulateur principal du métabolisme du fer : l'hepcidine. Enfin, ces résultats suggèrent que le muscle serait à l'origine de ces troubles et agirait sur le foie. En s'atrophiant sous l'effet de la microgravité, il favoriserait un état pro-inflammatoire systémique via notamment la transcription d'IL-6 qui, au niveau du foie activerait la transcription d'hepcidine via la voie IL-6/STAT3.

## Short Communication

# Simulated microgravity decreases circulating iron in rats: role of inflammation-induced hepcidin upregulation

Thibault Cavey<sup>1,2,3</sup>, Nicolas Pierre<sup>4</sup>, Kévin Nay<sup>4</sup>, Coralie Allain<sup>1,2</sup>, Martine Ropert<sup>1,3</sup>, Olivier Loréal<sup>1,2</sup> and Frédéric Derbré<sup>4</sup> 

<sup>1</sup>INSERM UMR 991 UMR, Rennes, France

<sup>2</sup>University of Rennes 1, Rennes, France

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, CHU Rennes, France

<sup>4</sup>Laboratory 'Movement, Sport and Health Sciences' (M2S), University Rennes 2-ENS Rennes, Bruz, France

Edited by: Philip Atherton

## New Findings

- **What is the central question of this study?**  
Although microgravity is well known to reduce circulating iron in astronauts, the underlying mechanism is still unknown. We investigated whether hepcidin, a key hormone regulating iron metabolism, could be involved in this deleterious effect.
- **What is the main finding and its importance?**  
We show that hindlimb suspension, a model of microgravity, stimulates the production of hepcidin in liver of rats. In agreement with the biological role of hepcidin, we found a decrease of circulating iron and an increase of spleen iron content in hindlimb-unloaded rats. Consequently, our study supports the idea that hepcidin could play a role in the alteration of iron metabolism parameters observed during spaceflight.

During spaceflight, humans exposed to microgravity exhibit an increase of iron storage and a reduction of circulating iron. Such perturbations could promote oxidative stress and anaemia in astronauts. The mechanism by which microgravity modulates iron metabolism is still unknown. Herein, we hypothesized that microgravity upregulates hepcidin, a hormone produced by the liver that is the main controller of iron homeostasis. To test this hypothesis, rats were submitted to hindlimb unloading (HU), the reference model to mimic the effects of microgravity in rodents. After 7 days, the mRNA level of hepcidin was increased in the liver of HU rats (+74%,  $P = 0.001$ ). In agreement with the biological role of hepcidin, we found an increase of spleen iron content (+78%,  $P = 0.030$ ) and a decrease of serum iron concentration (−35%,  $P = 0.002$ ) and transferrin saturation (−25%,  $P = 0.011$ ) in HU rats. These findings support a role of hepcidin in microgravity-induced iron metabolism alteration. Furthermore, among the signalling pathways inducing hepcidin mRNA expression, we found that only the interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 (IL-6/STAT3) axis was activated by HU, as shown by the increase of phospho-STAT3 (+193%,  $P < 0.001$ ) and of the hepatic mRNA level of haptoglobin (+167%,  $P < 0.001$ ), a STAT3-inducible gene, in HU rats. Taken together, these data support the idea

T. Cavey and N. Pierre contributed equally to this study.

## that microgravity may alter iron metabolism through an inflammatory process upregulating hepcidin.

(Received 18 November 2016; accepted after revision 9 January 2017; first published online 13 January 2017)

**Corresponding authors** F. Derbré: Laboratory 'Movement, Sport and Health Sciences', University Rennes 2-ENS Rennes, 35170 Bruz, France. Email: frederic.derbre@univ-rennes2.fr

O. Loréal: INSERM UMR991, CHU Pontchaillou, 35033 Rennes Cedex. Email: olivier.loreal@univ-rennes1.fr

### Introduction

In the future, the number and duration of manned spaceflights will inexorably increase. Space agencies plan to send astronauts to the moon, asteroids and mars, whereas private companies are developing a commercial exploitation of space travel by proposing future services such as 'space taxis' and space tourism. In this context, the effect of microgravity on human physiology needs to be understood better. In addition to the well-known loss of skeletal muscle and bone mass (Hargens & Vico, 2016), recent findings highlighted that microgravity affects iron metabolism (Zwart *et al.* 2013).

Iron plays a key role in numerous biological functions, including oxygen transport, enzyme activity and energy production. The human body contains 3–5 g of iron, with 65–75% being linked to haemoglobin, 10–20% stored in the liver, associated with the iron-storage protein ferritin, 10% found in myoglobin of striated muscles (Zhang, 2010) and the remainder localized in the different cell types. Humans exposed to microgravity exhibit a decrease of the circulating levels of iron and transferrin (Smith *et al.* 2005; Zwart *et al.* 2013). Additionally, an increase in iron storage has been reported in astronauts of the International Space Station (Zwart *et al.* 2013). These findings raise concern because excess iron in tissues can impair bone and muscle metabolism, disrupt immune function and increase the sensitivity to radiation injury (Reardon & Allen, 2009; Tsay *et al.* 2010). In contrast, a reduction in circulating iron may promote anaemia, a deleterious effect already observed during space missions and known as 'spaceflight anaemia' (Tavassoli, 1982). This phenomenon could limit the duration of space travel. Although the effects of microgravity on iron metabolism have been identified, the molecular mechanism driving such regulation remains unexplored.

Iron metabolism is mainly controlled by hepcidin, a peptide hormone secreted by the liver that reduces iron export through degradation of the iron exporter, ferroportin (Zhang, 2010). In addition, hepcidin reduces iron absorption by the duodenal enterocytes. Consequently, high levels of hepcidin induce both a decrease of serum iron and an increase of iron storage in cells expressing ferroportin, especially macrophages (Ganz, 2011).

From these data, we hypothesized that alteration of iron metabolism parameters during microgravity could be linked to hepatic hepcidin overexpression induced by iron-related and/or inflammatory signals. To test this hypothesis, we submitted rats to hindlimb unloading (HU), the reference model to simulate the effects of microgravity in rodents (Globus & Morey-Holton, 2016), and we analysed whether hepatic hepcidin expression and the related signal transduction pathways are modulated.

### Methods

#### Ethical approval

The protocol and procedure used in this study were in accordance with the local committee on Ethics in Research of Rennes (authorization 01259.03) and approved by the French Ministry of Higher Education.

#### Animals and experimental procedures

Male Wistar rats (10 weeks old; Janvier Labs, Le Genest St Isle, France) were randomly assigned to two groups: non-suspended (control,  $n = 8$ ) and hindlimb unloaded (HU,  $n = 8$ ) for 7 days. Hindlimb unloading was performed by using Morey's tail-suspension model (Morey-Holton & Globus, 2002). Rats were housed with food and water *ad libitum*. At the end of the protocol, rats were deeply anaesthetized with an i.p. injection of ketamine (100 mg kg<sup>-1</sup>) and xylazine (20 mg kg<sup>-1</sup>). Liver, spleen and gastrocnemius were harvested, weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Blood was collected from the vena cava and the animals were killed by exsanguination. Haemoglobin concentrations were determined using HemoCue<sup>®</sup> 201+ system (HemoCue, AB, Meaux, France). Blood was centrifuged at 1500g for 10 min, after which serum was removed and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### Biochemical methods

Serum iron and unsaturated iron-binding capacity (UIBC) were measured in the biochemistry laboratory (Rennes Pontchaillou Hospital) on Cobas 8000 analyser Roche<sup>®</sup> (Cobas<sup>®</sup> reagents 03183696 122 and 04536355 190, respectively, Roche Diagnostics, Meylan, France).

Serum transferrin saturation was calculated as [serum iron/(serum iron + UIBC)]  $\times$  100. Liver and spleen iron concentrations were quantified as previously described (Barry & Sherlock, 1971). Serum interleukin-6 (IL-6) concentrations were determined using a rat IL-6 detection kit according to the manufacturer's protocol (BioLegend, San Diego, CA, USA).

### Histological analysis

Spleen and liver samples were fixed in 4% paraformaldehyde fixative for 24 h and paraffin embedded. Serial transverse sections 4  $\mu$ m thick were obtained from each sample using a Leica microtome and were mounted on glass slides. To visualize ferric iron deposits, deparaffinized tissue sections were stained with Perls' Prussian Blue.

### RNA extraction and quantitative real-time PCR

RNA extraction and quantitative real-time PCR were performed as previously described (Pierre *et al.* 2013). Analysis was done using the  $2^{-\Delta CT}$  method with *HPRT* (liver and spleen) or *RPL19* (gastrocnemius) as a reference gene. The following primer sequences were used: *IL-6* (forward TCCGCAAGAGACTTCCAGC and reverse GTCTGTTGTGGGTGGTATCCTCT); hepcidin (forward CTGCAGCCTTGGCATGG and reverse CAGCAGCGCA CTGTCATCA); haptoglobin (forward AACACTTGGTT CGTTATCGCTG and reverse CCACACACTGCCTCAC ACTTG); *HPRT* (forward CTGATTATGGACAGGACTG AAAGAC and reverse CCAGCAGGTCAGCAAAGAAGT); and *RPL19* (forward CAATGCCAACTCTCGTCAACAG and reverse CATCCAGGTCACCTTCTCGG).

### Western blotting

Protein extraction and Western blots were performed as previously described (Salaun *et al.* 2016). The following antibodies were used: ERK1-2 (1:1000; 9102, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), p-ERK1-2-Thr<sup>202</sup>Tyr<sup>204</sup> (1:1000; 9101, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), p-STAT3-Tyr<sup>705</sup> (1:1000; 9131, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), p-SMAD1/5/8-Ser<sup>463/465</sup> (1:1000; ab92698 Abcam, Danvers, MA, USA), SMAD5 (1:1000; Cell Signaling, Danvers, MA, USA) and  $\alpha$ -actin (1:700; A2172 Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA).

### Statistical analysis

Normality and equality of variances were checked using a Kolmogorov–Smirnov and Fisher test, respectively. If one of these two tests failed, we checked the significance using a Mann–Whitney *U* test and data were presented with a box plot. When normality and equal variance were met, we used Student's unpaired *t* test and data were presented as the mean  $\pm$  SD. The level of significance was set at  $P < 0.05$ .

## Results

### Hindlimb unloading induces iron misdistribution

Initially, we aimed to check the disruption of iron metabolism induced by our model of microgravity. We found that available iron was reduced in HU rats as shown by the decrease of serum iron concentration ( $-35\%$ ,  $P = 0.002$ ) and transferrin saturation ( $-25\%$ ,  $P = 0.011$ ; Fig. 1A and B). This reduction of systemic iron was not associated with changes in haemoglobin concentration ( $15.8 \pm 0.4$  versus  $16.6 \pm 0.30$  g dl<sup>-1</sup>,  $P = 0.153$ ; Fig. 1C). To characterize the effect of HU on iron metabolism better, we measured iron concentration in liver and spleen, the main organs responsible for iron storage. Iron content increased in the spleen of HU animals ( $+78\%$ ,  $P = 0.030$ ; Fig. 1E), whereas liver iron concentration was not significantly modified ( $P = 0.217$ ; Fig. 1D). These results were supported by histological analyses, where iron deposits were more visible in the spleen of HU animals (Fig. 1F). It is noteworthy that spleen weight was not reduced in HU conditions [ $0.25 \pm 0.04$  versus  $0.23 \pm 0.03$  g (100 g body weight)<sup>-1</sup>,  $P = 0.437$ ; Table 1], thus dismissing an increase of spleen iron concentration related to a modification of spleen weight. Taken together, our results indicate that simulated microgravity induces an increase of iron storage in the spleen associated with a reduction of the circulating iron.

### Hindlimb unloading upregulates hepatic hepcidin expression via the IL-6/STAT3 signalling pathway

To investigate the mechanism by which HU induces iron misdistribution, we measured in liver the expression of hepcidin, the master regulator of iron metabolism. We found that HU increased the hepcidin mRNA level ( $+74\%$ ,  $P = 0.001$ , Fig. 2A), thereby supporting a role of this hormone in the alteration of iron homeostasis observed in our experiment. Hepcidin expression is known to be upregulated by BMP6/SMAD, ERK1/2 and IL-6/STAT3 signalling pathways (Zhao *et al.* 2013). Therefore, we investigated whether these three signalling pathways were activated in the liver of HU animals. We observed that HU increased STAT3 phosphorylation state ( $+193\%$ ,  $P < 0.001$ ; Fig. 2C and F), whereas HU modulated neither phospho-ERK1-2 nor phospho-SMAD1/5/8 levels (Fig. 2C, D and E). STAT3 is a transcription factor well known to regulate genes of the acute phase response, such as haptoglobin (Alonzi *et al.* 2001). Herein, we observed an elevation of the mRNA level of haptoglobin ( $+167\%$ ,  $P < 0.001$ ; Fig. 2B) in the liver of HU rats. Taken together, these results support the suggestion that HU induces STAT3 pathway activation in the liver. Consequently, we propose that stimulated microgravity promotes a transcriptional regulation of hepcidin through the IL-6/STAT3 signalling pathway.

## Interleukin-6 mRNA increases in skeletal muscle of HU rats

Given that IL-6 is the main activator of STAT3, we analysed its mRNA level in liver, spleen and gastrocnemius. We found that *IL-6* mRNA level increased in gastrocnemius of HU animals (+135%,  $P = 0.028$ ; Fig. 3C), whereas this was not the case in spleen ( $P = 0.444$ ; Fig. 3B) and liver ( $P = 0.657$ ; Fig. 3A). The increase of *IL-6* mRNA in gastrocnemius was probably related to the atrophic process. Indeed, HU rats exhibited a 12% ( $P = 0.004$ ; Table 1) loss of gastrocnemius mass, a deleterious effect well known to be associated with inflammation. The serum concentration of IL-6 remained below the limit of sensitivity of the assay in both control and HU animals.

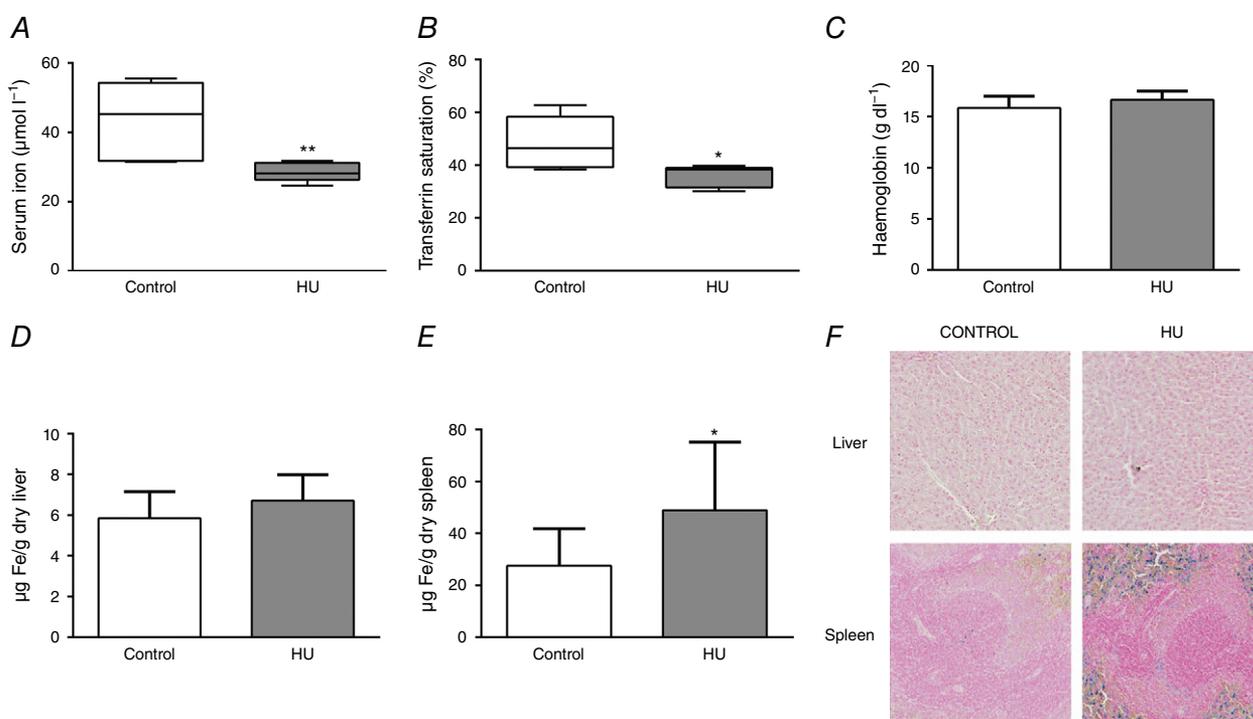
## Discussion

By using the HU model, we demonstrated that simulated microgravity induces upregulation of hepcidin, the master regulator of iron metabolism. This finding highlights that hepcidin could play a key role in the alteration of iron metabolism induced by microgravity. Furthermore, our data support the idea that HU induced hepcidin upregulation through the inflammatory

signalling pathway IL-6/STAT3. This study constitutes a first step towards a better understanding of the mechanism by which microgravity alters iron metabolism.

The HU model has been widely used for decades to understand the effects of microgravity observed during spaceflight. This model presents the advantage of exploring the organ-specific responses to microgravity, a key characteristic of the spaceflight environment, and excludes the concomitant effects of the astronaut's exposure to radiation or hyperoxia. The neuroendocrine stress occurring during the first few days, depending on the experiment, is the main weakness recognized for the HU model, because it could mask or amplify adaptive responses to microgravity (Globus & Morey-Holton, 2016). However, as highlighted by Globus & Morey-Holton (2016), this acute stress in rodents may mimic the acute stress occurring in astronaut crews during launch and the first days of spaceflight (Stowe *et al.* 2011; Mehta *et al.* 2014).

As observed during space missions, microgravity reduces the serum iron concentration and increases iron storage in humans (Smith *et al.* 2005). Our model of microgravity, HU, reproduces those effects and constitutes *de facto* an appropriate experimental design to study the effect of spaceflight on iron metabolism. In



**Figure 1. Hindlimb unloading (HU) induces iron redistribution**

A, serum iron concentration. B, transferrin saturation. C, haemoglobin concentration. D, liver iron concentration. E, spleen iron concentration. F, histological detection of iron deposits in liver and spleen sections by Perls' iron staining. Significance was checked using the Mann–Whitney *U* test (A and B) or Student's unpaired *t* test (C–E). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

**Table 1. Effect of hindlimb unloading on gastrocnemius and spleen weights**

Parameter	Control group	Hindlimb unloading group
Body weight (g)	301 ± 23	272 ± 26***
Ratio of gastrocnemius weight to body weight [g (100 g) <sup>-1</sup> ]	530.6 ± 40.8	459.3 ± 42.8**
Ratio of liver weight to body weight [g (100 g) <sup>-1</sup> ]	4.09 ± 0.36	3.59 ± 0.39***
Ratio of spleen weight to body weight [g (100 g) <sup>-1</sup> ]	0.25 ± 0.04	0.23 ± 0.03

Values are means ± SD. Significance was checked using Student's unpaired *t* test. \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.

our experiment, we found that simulated microgravity increased iron storage in the spleen and reduced iron availability, as shown by the reduction of circulating iron and transferrin saturation. In other words, the increase of iron storage by HU occurred to the detriment of the blood iron content, a change that looks like an effect of hepcidin. Indeed, this hormone promotes a reduction of the circulating iron through induction of iron sequestration in cells expressing ferroportin, such as the spleen resident macrophages (Zhao *et al.* 2013). Remarkably, we observed such an effect in HU rats, and this was associated with an increase of the hepcidin mRNA level. Although this result does not definitively prove a causal link between hepcidin upregulation and iron misdistribution, it supports a potential role of this hormone in the alteration of iron metabolism induced by microgravity. However, one study reported that, despite a clear alteration of iron metabolism, astronauts did not exhibit any change of the circulating level of hepcidin (Zwart *et al.* 2013). Various confounding factors related to space travel, including a disturbance of circadian rhythms (Schaap *et al.* 2013) and hyperoxia, as well as the low number of subjects, could explain the lack of significant differences reported in this study (Zwart *et al.* 2013). Alternatively, we cannot exclude the possibility that HU and microgravity alone exert a distinct effect on hepcidin production.

To go further in the understanding of hepcidin regulation by microgravity, we investigated the signalling pathways modulating hepcidin expression. The BMP/SMAD signalling pathway is the main positive regulator of hepcidin (Zhao *et al.* 2013). More specifically, it has been demonstrated that an increase in both transferrin saturation and liver iron content promotes BMP/SMAD activation (Core *et al.* 2014). Here, we showed that hepatic phospho-SMAD1/5/8 levels were not affected by HU, whereas serum transferrin saturation

was decreased and liver iron content was unchanged. Thus, our data did not support an implication of the BMP/SMAD axis in HU-induced hepcidin upregulation. In addition to the BMP/SMAD pathway, evidence from *in vitro* studies and *Tfr2/Hfe* null mice supports the view that the ERK1/2 signalling pathway is a positive regulator of hepcidin (Ramey *et al.* 2009; Poli *et al.* 2010). Here, we observed that 7 days of HU did not affect phospho-ERK1/2 levels, thus showing that the ERK1/2 signalling pathway is not involved in HU-induced hepcidin upregulation. Finally, we explored the IL-6/STAT3 signalling pathway known to be regulated by inflammation (Zhao *et al.* 2013). Interestingly, we observed that HU increased the phosphorylation state of STAT3 and the mRNA level of haptoglobin, a STAT3-inducible gene. All together, these data indicate that HU probably stimulates hepcidin synthesis through STAT3 activation.

The inflammatory cytokine IL-6 is well known to activate STAT3, which in turn promotes hepcidin production (Wrighting & Andrews, 2006). Given that IL-6 is a well-known myokine released by atrophied muscle, we analysed its mRNA level in gastrocnemius. In agreement with others (Caron *et al.* 2009; Kwon *et al.* 2015), we found that the *IL-6* mRNA level increased in the gastrocnemius of HU animals. As HU rats exhibited a 12% loss of gastrocnemius mass, HU-induced IL-6 upregulation is most probably related to inflammation associated with the atrophic process. Indeed, atrophied myotubes produce IL-6, an effect which is mediated by the nuclear factor- $\kappa$ B inflammatory pathway (Yamaki *et al.* 2012). Moreover, researchers in our laboratory and other studies have demonstrated that the nuclear factor- $\kappa$ B signalling pathway was activated early in skeletal muscle from unloaded rats (Judge *et al.* 2007; Salaun *et al.* 2016).

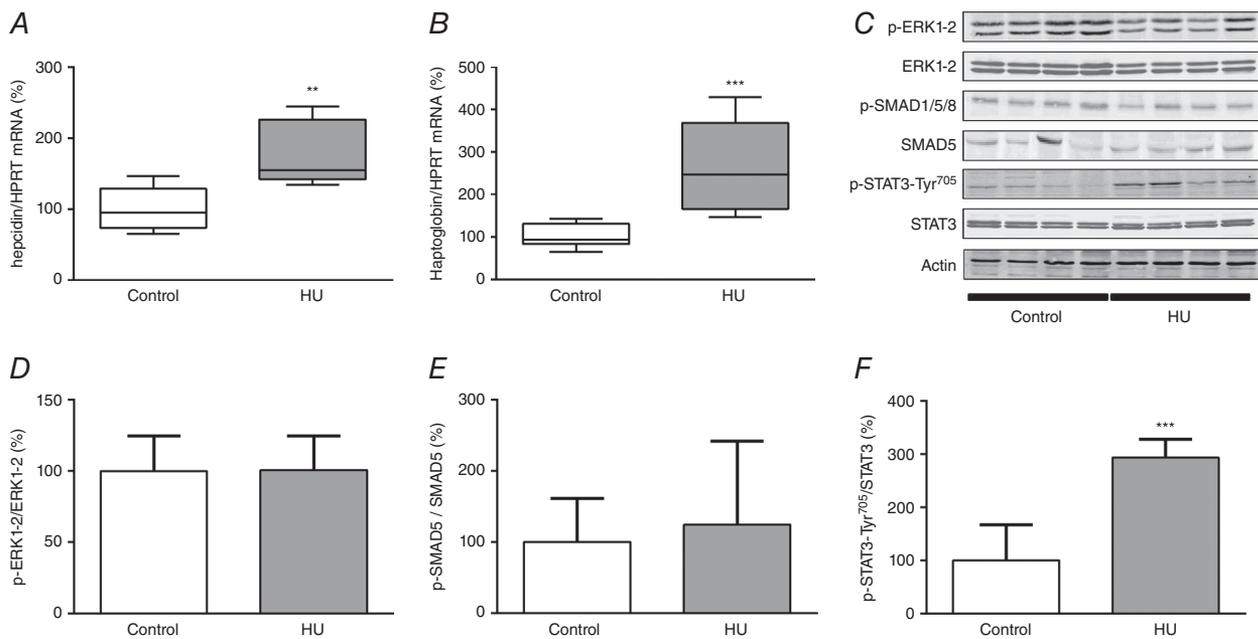
Although we showed an increase of the mRNA level of IL-6 in the gastrocnemius of HU rats, we were not able to detect IL-6 in the blood. Unfortunately, serum IL-6 levels remained undetectable in both control and HU animals. This sensitive issue is frequently observed for IL-6 owing to the moderate inflammation induced by microgravity (Xu *et al.* 2013; Crucian *et al.* 2014). The minimal detectable level of IL-6 with the ELISA kits, including those used in this study, is generally between 5 and 10 pg ml<sup>-1</sup>, whereas *in vitro* studies have demonstrated in hepatocytes that small amounts of IL-6 (<2 pg ml<sup>-1</sup>) were able to induce a 30-fold increase of the hepcidin mRNA level (Memoli *et al.* 2010). In our study, the impossibility of detecting the circulating level of IL-6 does not mean that this cytokine has no role on hepcidin expression. Dedicated studies are needed to determine the implication of IL-6 in HU-induced hepcidin upregulation.

The alteration of iron metabolism induced by microgravity raises concern because iron accumulation in tissues could promote oxidative damage through

the Fenton reaction. It has been proposed that such a mechanism could accelerate loss of bone mass in astronauts, a population already exposed to a higher degree of oxidative damage because of cosmic radiation (Zwart *et al.* 2013). In view of our results, the role of hepcidin in microgravity-induced oxidative damage needs to be investigated. In contrast, our results suggest that hepcidin could contribute to 'spaceflight anaemia'. Indeed, the reduction of available iron observed in HU rats could reduce erythropoiesis. In the present study, we did not report differences in haemoglobin

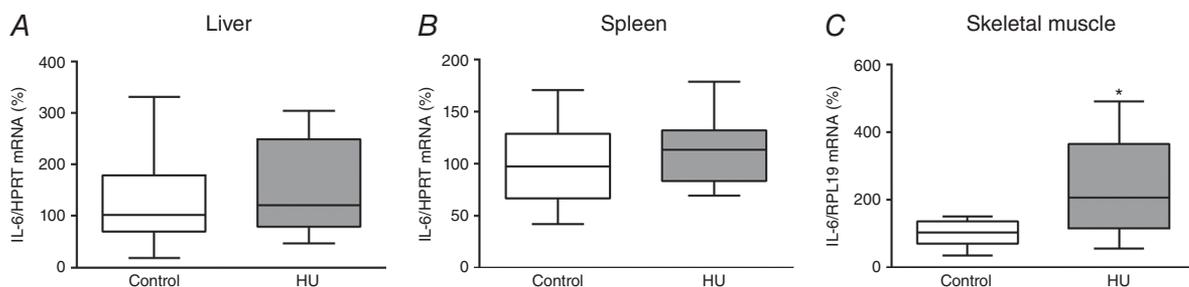
concentration between control and HU animals. This result is in accordance with previous studies showing that microgravity did not reduce haemoglobin concentration; it decreases red blood cell mass and plasma volume, thus maintaining haemoglobin concentration (Tavassoli, 1982). Consequently, appropriate markers are needed to study spaceflight anaemia; this was not the goal of the present study.

In humans, microgravity is simulated through bedrest, a situation which also alters iron metabolism (Zwart *et al.* 2009b). Studies have shown that bedrest induces



**Figure 2. Hindlimb unloading (HU) induces hepatic hepcidin upregulation via the IL-6/STAT3 signalling pathway**

A, hepatic hepcidin mRNA level. B, hepatic haptoglobin mRNA level. C, representative blots of p-ERK1-2-Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>, ERK1-2, p-SMAD1/5/8 Ser<sup>463/465</sup>, SMAD5, p-STAT3-Tyr<sup>705</sup>, STAT3 and actin. D, hepatic ERK1-2 activation. E, hepatic SMAD1/5/8 activation. F, hepatic STAT3 activation. Significance was checked using the Mann–Whitney *U* test (A and B) or Student's unpaired *t* test (D–F). \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.



**Figure 3. Interleukin-6 mRNA increases in skeletal muscle of hindlimb-unloaded (HU) rats**

Interleukin-6 mRNA levels were measured in liver (A), spleen (B) and gastrocnemius (C). Significance was checked using the Mann–Whitney *U* test. \**P* < 0.05.

a reduction of the circulating concentration of transferrin (Zwart *et al.* 2009a,b; Morgan *et al.* 2012). In a similar manner to HU, bedrest is an immobilization model where skeletal muscle wasting occurs rapidly. This atrophic process is associated with an elevation of the circulating level of IL-6 (Bosutti *et al.* 2008; Mutin-Carnino *et al.* 2014). As already mentioned, this cytokine stimulates the production of hepcidin and could therefore alter iron metabolism. To the best of our knowledge, no studies have measured hepcidin in bedridden patients. As a consequence, it is unknown whether hepcidin contributes to the alteration in iron metabolism observed in bedridden patients. In future studies, particular attention must be paid to hepcidin in bedridden patients; inappropriate modulation of hepcidin could have multiple deleterious effects, such as oxidative stress and anaemia.

In summary, similar to spaceflight, we found that HU induces an increase of iron storage in the spleen and a decrease of circulating iron. Given that these results are associated with an elevation of hepcidin in the liver of HU animals, we propose that hepcidin could be involved in the effects of microgravity on iron metabolism. Furthermore, we show that the IL-6/STAT3 signalling pathway seems responsible for HU-induced upregulation of hepcidin. This study provides new directions to investigate the mechanism by which microgravity alters iron metabolism.

## References

- Alonzi T, Maritano D, Gorgoni B, Rizzuto G, Libert C & Poli V (2001). Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation [correction of activation] in the liver. *Mol Cell Biol* **21**, 1621–1632.
- Barry M & Sherlock S (1971). Measurement of liver-iron concentration in needle-biopsy specimens. *Lancet* **1**, 100–103.
- Bosutti A, Malaponte G, Zanetti M, Castellino P, Heer M, Guarnieri G & Biolo G (2008). Calorie restriction modulates inactivity-induced changes in the inflammatory markers C-reactive protein and pentraxin-3. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 3226–3229.
- Caron AZ, Drouin G, Desrosiers J, Trens F & Grenier G (2009). A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse. *J Appl Physiol* **106**, 2049–2059.
- Core AB, Canali S & Babitt JL (2014). Hemojuvelin and bone morphogenetic protein (BMP) signaling in iron homeostasis. *Front Pharmacol* **5**, 104.
- Crucian BE, Zwart SR, Mehta S, Uchakin P, Quiriarte HD, Pierson D, Sams CF & Smith SM (2014). Plasma cytokine concentrations indicate that *in vivo* hormonal regulation of immunity is altered during long-duration spaceflight. *J Interferon Cytokine Res* **34**, 778–786.
- Ganz T (2011). Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood* **117**, 4425–4433.
- Globus RK & Morey-Holton E (2016). Hindlimb unloading: rodent analog for microgravity. *J Appl Physiol* **120**, 1196–1206.
- Hargens AR & Vico L (2016). Long-duration bed rest as an analog to microgravity. *J Appl Physiol* **120**, 891–903.
- Judge AR, Koncarevic A, Hunter RB, Liou HC, Jackman RW & Kandarian SC (2007). Role for I $\kappa$ B $\alpha$ , but not c-Rel, in skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C372–C382.
- Kwon OS, Tanner RE, Barrows KM, Runtsch M, Symons JD, Jalili T, Bikman BT, McClain DA, O'Connell RM & Drummond MJ (2015). MyD88 regulates physical inactivity-induced skeletal muscle inflammation, ceramide biosynthesis signaling, and glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **309**, E11–E21.
- Mehta SK, Laudenslager ML, Stowe RP, Crucian BE, Sams CF & Pierson DL (2014). Multiple latent viruses reactivate in astronauts during Space Shuttle missions. *Brain Behav Immun* **41**, 210–217.
- Memoli B, Salerno S, Procino A, Postiglione L, Morelli S, Sirico ML, Giordano F, Ricciardone M, Drioli E, Andreucci VE & Bartoli LD (2010). A translational approach to micro-inflammation in end-stage renal disease: molecular effects of low levels of interleukin-6. *Clin Sci (Lond)* **119**, 163–174.
- Morey-Holton ER & Globus RK (2002). Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* **92**, 1367–1377.
- Morgan JL, Zwart SR, Heer M, Ploutz-Snyder R, Ericson K & Smith SM (2012). Bone metabolism and nutritional status during 30-day head-down-tilt bed rest. *J Appl Physiol* **113**, 1519–1529.
- Mutin-Carnino M, Carnino A, Roffino S & Chopard A (2014). Effect of muscle unloading, reloading and exercise on inflammation during a head-down bed rest. *Int J Sports Med* **35**, 28–34.
- Pierre N, Deldicque L, Barbé C, Naslain D, Cani PD & Francaux M (2013). Toll-like receptor 4 knockout mice are protected against endoplasmic reticulum stress induced by a high-fat diet. *PLoS One* **8**, e65061.
- Poli M, Luscieti S, Gandini V, Maccarinelli F, Finazzi D, Silvestri L, Roetto A & Arosio P (2010). Transferrin receptor 2 and HFE regulate furin expression via mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/Erk) signaling. Implications for transferrin-dependent hepcidin regulation. *Haematologica* **95**, 1832–1840.
- Ramey G, Deschemin JC & Vaulont S (2009). Cross-talk between the mitogen activated protein kinase and bone morphogenetic protein/hemojuvelin pathways is required for the induction of hepcidin by holotransferrin in primary mouse hepatocytes. *Haematologica* **94**, 765–772.
- Reardon TF & Allen DG (2009). Iron injections in mice increase skeletal muscle iron content, induce oxidative stress and reduce exercise performance. *Exp Physiol* **94**, 720–730.
- Salaun E, Lefeuve-Orfila L, Cavey T, Martin B, Turlin B, Ropert M, Loreal O & Derbre F (2016). Myriocin prevents muscle ceramide accumulation but not muscle fiber atrophy during short-term mechanical unloading. *J Appl Physiol* **120**, 178–187.

- Schaap CC, Hendriks JC, Kortman GA, Klaver SM, Kroot JJ, Laarakkers CM, Wiegerinck ET, Tjalsma H, Janssen MC & Swinkels DW (2013). Diurnal rhythm rather than dietary iron mediates daily hepcidin variations. *Clin Chem* **59**, 527–535.
- Smith SM, Zwart SR, Block G, Rice BL & Davis-Street JE (2005). The nutritional status of astronauts is altered after long-term space flight aboard the International Space Station. *J Nutr* **135**, 437–443.
- Stowe RP, Sams CF & Pierson DL (2011). Adrenocortical and immune responses following short- and long-duration spaceflight. *Aviat Space Environ Med* **82**, 627–634.
- Tavassoli M (1982). Anemia of spaceflight. *Blood* **60**, 1059–1067.
- Tsay J, Yang Z, Ross FP, Cunningham-Rundles S, Lin H, Coleman R, Mayer-Kuckuk P, Doty SB, Grady RW, Giardina PJ, Boskey AL & Vogiatzi MG (2010). Bone loss caused by iron overload in a murine model: importance of oxidative stress. *Blood* **116**, 2582–2589.
- Wrighting DM & Andrews NC (2006). Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* **108**, 3204–3209.
- Xu X, Tan C, Li P, Zhang S, Pang X, Liu H, Li L, Sun X, Zhang Y, Wu H, Chen X & Ge Q (2013). Changes of cytokines during a spaceflight analog - a 45-day head-down bed rest. *PLoS One* **8**, e77401.
- Yamaki T, Wu CL, Gustin M, Lim J, Jackman RW & Kandarian SC (2012). Rel A/p65 is required for cytokine-induced myotube atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* **303**, C135–C142.
- Zhang AS (2010). Control of systemic iron homeostasis by the hemojuvelin-hepcidin axis. *Adv Nutr* **1**, 38–45.
- Zhao N, Zhang AS & Enns CA (2013). Iron regulation by hepcidin. *J Clin Invest* **123**, 2337–2343.
- Zwart SR, Crawford GE, Gillman PL, Kala G, Rodgers AS, Rogers A, Inniss AM, Rice BL, Ericson K, Coburn S, Bourbeau Y, Hudson E, Mathew G, Dekerlegand DE, Sams CF, Heer MA, Paloski WH & Smith SM (2009a). Effects of 21 days of bed rest, with or without artificial gravity, on nutritional status of humans. *J Appl Physiol* **107**, 54–62.
- Zwart SR, Morgan JL & Smith SM (2013). Iron status and its relations with oxidative damage and bone loss during long-duration space flight on the International Space Station. *Am J Clin Nutr* **98**, 217–223.
- Zwart SR, Oliver SA, Feserman JV, Kala G, Krauhs J, Ericson K & Smith SM (2009b). Nutritional status assessment before, during, and after long-duration head-down bed rest. *Aviat Space Environ Med* **80**, A15–A22.

## Additional information

### Competing interests

None declared.

### Author contributions

F.D. and O.L. conceived and designed the study. T.C., N.P., K.N., C.A., M.R. and F.D. performed the experiments. N.P. and K.N. analysed the data and prepared the figures. T.C., N.P., F.D. and O.L. drafted the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

### Funding

This study was supported by grants from the Brittany Research Council (Stratégie d'Attractivité Durable (SAD) program - MusFer no. 8802) and ID2Santé-Bretagne.

### Acknowledgements

The authors thank Erwan Salaun and Pascale Bellaud (H<sub>2</sub>P<sub>2</sub> platform, University Rennes 1, Rennes) for technical help during animal experimentation and histological analyses.

## II. Etude N°2 : Le reconditionnement intermittent prévient l'atrophie musculaire induite par l'hypoactivité mais ne prévient pas la réduction de la biodisponibilité en fer

### Introduction :

Les astronautes dans l'espace subissent une perte de capacités physiques et fonctionnelles réduisant ainsi la capacité à assurer leurs missions et à récupérer physiquement. L'hypoactivité en condition d'impesanteur contribue principalement à ce déficit fonctionnel en favorisant, entre autres, une perte de masse et force musculaire, des altérations cardiorespiratoires, une ostéoporose et une anémie. (De Santo et al., 2005; Pavy-Le Traon et al., 2007; Pierre et al., 2016). L'hypoactivité induite par l'alitement et les vols spatiaux affecte la distribution du fer dans l'organisme se caractérisant par une augmentation de son stockage et une diminution de sa biodisponibilité au niveau sanguin (Smith *et al.*, 2005; Zwart *et al.*, 2013a). Ces altérations pourraient jouer un rôle clé dans l'anémie du vol spatial en raison d'une diminution de la biodisponibilité du fer pour la synthèse de globules rouges lors de l'érythropoïèse. D'un autre côté, le stockage accru de fer dans certains organes pourrait également favoriser l'atrophie musculaire ou encore l'ostéoporose constatées chez des personnes alitées ou chez les astronautes. En effet, un stockage plus important en fer dans ces organes favorise l'apparition d'un stress oxydant chronique via la réaction de Fenton (Reardon and Allen, 2009; Tsay et al., 2010).

Le métabolisme du fer est principalement régulé par l'hepcidine, un peptide composé de 25 acides aminés sécrété par le foie. Ce dernier induit une séquestration du fer tissulaire et limite l'entrée de ce dernier au niveau des entérocytes du duodénum en dégradant une protéine d'export cellulaire du fer appelée ferroportine (Zhang, 2010). Ainsi, l'hepcidine réduit la biodisponibilité de fer au niveau systémique et augmente le stockage de cet élément dans les cellules exprimant de la ferroportine (tout particulièrement les macrophages). La synthèse d'hepcidine est accélérée au niveau du foie en raison : 1) de l'accumulation de fer dans le foie qui active la voie de signalisation BMP / SMAD, 2) d'une augmentation du fer lié à la transferrine qui active les kinases extracellulaires régulées par le signal (ERK1/2) 3) d'un état inflammatoire qui active la voie de signalisation IL-6 / JAK2/STAT3 (Ramey et al., 2010; Zhao et al., 2013). En utilisant le modèle de suspension par la queue (HU) chez le rat, lors de l'étude

n°1, notre équipe a mis en évidence qu'une courte période d'hypoactivité (7 jours) induit une augmentation du stockage du fer, particulièrement dans la rate, et diminue parallèlement la concentration sanguine en fer ainsi que la saturation en transferrine (Cavey et al., 2017). Cette redistribution du fer dans l'organisme était associée à une augmentation de la transcription d'hepcidine dans le foie des animaux (Cavey et al., 2017). L'hepcidine apparaît donc comme une hormone clé dans les altérations du métabolisme du fer se produisant lors de périodes d'hypoactivité. De manière intéressante, nous avons aussi mis en exergue des augmentations concomitantes de l'activité protéique de STAT3 dans le foie et de la transcription d'IL-6 dans le muscle atrophié (Cavey et al., 2017). Ces données suggèrent un dialogue inter-organes entre le muscle squelettique et le foie activé lors de courtes périodes d'hypoactivité qui réduirait la biodisponibilité du fer dans l'organisme. Ainsi, cibler le muscle afin limiter cette réduction ferriques apparaît comme une perspective pertinente.

Dans ce contexte, la gravité artificielle intermittente est proposée depuis plusieurs dizaines d'années comme une contre-mesure efficace pour limiter l'atrophie musculaire. L'expérience pilote de la NASA en 2006 fut la première étude chez l'homme à étudier l'efficacité de la gravité artificielle comme contre-mesure face aux méfaits de l'hypoactivité. Lors de cette étude, 1 heure quotidienne de centrifugation à 2,5G pendant les 21 jours d'alitement suffit à prévenir partiellement l'atrophie musculaire (Caiozzo et al., 2009; Symons et al., 2009). Chez le rongeur, le reconditionnement intermittent durant des périodes de suspension par la queue est également efficace pour limiter l'atrophie du muscle soléaire, la diminution des diamètres de fibres (CSA) ainsi que la perte de force. L'efficacité de cette contre-mesure dépend par contre des modalités de suspension et de reconditionnement (Bangart et al., 1997; D'Aunno et al., 1990, 1992; Hauschka et al., 1988; Thomason et al., 1987).

L'objectif de cette deuxième étude est de déterminer si le muscle squelettique joue un rôle dans les altérations du métabolisme du fer associées à l'hypoactivité en s'appuyant sur un protocole de reconditionnement intermittent chez le rongeur. Nous émettons l'hypothèse que limiter l'atrophie musculaire via un reconditionnement intermittent sera associé à une modulation de la synthèse d'hepcidine, et par conséquent limitera la réduction de la biodisponibilité en fer et le stockage tissulaire.

### **Matériel et méthodes:**

Pour répondre à cette hypothèse, nous enrichissons notre modèle de suspension par la queue avec une nouvelle modalité : une recharge intermittente d'1h par jour (Fiche méthodologique n°1, page 184) (Morey-Holton and Globus, 2002). La durée de la suspension est étendue ici à 14 jours afin d'observer si les altérations du métabolisme du fer étudiées précédemment à 7 jours sont toujours effectives à plus long terme. Ainsi, dans cette nouvelle étude, 27 rats Wistar mâles sont répartis en 3 groupes expérimentaux : Contrôle (CTL, n=9), Suspendu (HU, n=9) et Suspendu décroché une heure par jour (HU-IR). Après 14 jours, les rats sont sacrifiés et le sang prélevé par ponction intracardiaque puis centrifugé afin d'en extraire le sérum. Le foie, la rate et le muscle soléaire sont prélevés, pesés puis congelés à -80°C dans l'attente d'analyses.

### **Résultats :**

Après 14 jours de protocole, la concentrations de fer dans le sang ainsi que la saturation en transferrine sont diminuées dans le groupe HU comparé au groupe CTL. Ces résultats sont accompagnés d'une augmentation de la transcription d'hepcidine comparable à l'étude N°1. Cependant, contrairement à cette dernière, nous ne notons aucune augmentation du stockage intra-organe dans le groupe suspendu, que ce soit dans la rate, dans le foie ou dans le muscle squelettique. De manière intéressante, toutes les altérations en lien avec l'atrophie musculaire (i.e. diminution de la masse musculaire, réduction du diamètre des fibres, perturbations des voies de protéosynthèse et de protéolyse) ainsi que le changement typologique habituellement initié (i.e. lent vers rapide) dans le soléaire sont significativement atténués dans le groupe HU-IR comparativement au groupe HU. En revanche, ces bénéfices au niveau musculaire ne s'accompagnent pas d'un effet préventif du reconditionnement intermittent sur le métabolisme du fer et sur la transcription d'hepcidine.

### **Conclusion :**

Ces résultats confirment que le métabolisme du fer est toujours dérégulé après 14 jours d'hypoactivité. Malgré le fait que nous ne retrouvons pas le fer en surcharge dans les tissus, sa biodisponibilité reste significativement diminuée. Ces résultats s'accompagnent également d'une transcription hépatique d'hepcidine augmentée lors de la suspension. En revanche, des trois voies de signalisations connues pour promouvoir cette transcription, aucune ne semble activée. Nos données démontrent que, malgré les effets bénéfiques

indiscutables du reconditionnement intermittent sur le muscle squelettique, cette contre-mesure ne prévient pas les altérations du métabolisme du fer. Ces résultats questionnent par conséquent le rôle du muscle dans les altérations du métabolisme du fer induites par l'hypoactivité.

1 *Manuscript Submitted to American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and*  
2 *Comparative Physiology*

3 **Title: Intermittent reloading does not prevent decrease in iron availability and hepcidin**  
4 **upregulation caused by hindlimb unloading**  
5

6 Kévin Nay<sup>1,2</sup>, David Martin<sup>1</sup>, Luz Orfila<sup>1</sup>, Dany Saligaut<sup>1</sup>, Brice Martin<sup>1</sup>, Mathieu Horeau<sup>1</sup>,  
7 Thibaut Cavey<sup>3,4</sup>, Moussa Kenawi<sup>3</sup>, Marie-Laure Island<sup>3,4</sup>, Martine Ropert<sup>3,4</sup>, Olivier Loréal<sup>3</sup>,  
8 Christelle Koechlin-Ramonatxo<sup>2</sup>, Frédéric Derbré<sup>1</sup>.

9  
10 <sup>1</sup>Laboratory “Movement Sport and Health Sciences” EA7470, University of Rennes/ENS  
11 Rennes, France

12 <sup>2</sup>DMEM, Univ Montpellier, INRA, Montpellier, France

13 <sup>3</sup>INSERM 1241, University of Rennes, Nutrition Metabolisms and Cancer (NuMeCan),  
14 Rennes, France

15 <sup>4</sup>Department of Biochemistry, CHU Rennes, France  
16  
17

18 **Running head:** Hindlimb unloading decreases iron availability

19 **Keywords :** disuse, physical inactivity, crosstalk, myosin heavy chain, iron overload  
20

21 **Corresponding author:**

22 Frederic Derbré, PhD, Associate professor

23 Laboratory “Movement, Sport and Health Sciences” – EA7470

24 University of Rennes / ENS Rennes, 35170 Bruz, France

25 Mail : [frederic.derbre@univ-rennes2.fr](mailto:frederic.derbre@univ-rennes2.fr)

26 Phone : (0033)290091587

27 **ABSTRACT**

28 During spaceflight, humans exposed to microgravity exhibit muscle atrophy associated to iron  
29 storage and reduction of iron availability. We previously observed in rats that hepcidin plays a  
30 key role in iron misdistribution, and suggested that a crosstalk between skeletal muscle and  
31 liver could occur to regulate hepcidin synthesis during simulated microgravity. The present  
32 study was therefore designed to explore in rats the long-term effects of simulated microgravity  
33 on iron metabolism, and if intermittent reloading by targeting skeletal muscle atrophy  
34 constitutes an efficient countermeasure to limit iron misdistribution. To this purpose, we  
35 exposed Wistar rats to 14 days of hindlimb unloading (HU) combined or not with daily  
36 intermittent reloading (IR). After 14 days of HU, we report a significant reduction of serum  
37 iron concentration and transferrin saturation combined to hepatic hepcidin mRNA  
38 upregulation. However, the main signaling pathways involved in hepcidin synthesis in the liver  
39 including BMP/SMAD, IL6/STAT3 and ERK1/2 remain unaffected. Contrary to 7 days of HU,  
40 iron concentrations in spleen, liver and skeletal muscle do not differ after 14 days between  
41 control and HU animals. Despite the benefits of IR to limit soleus muscle atrophy and slow-to-  
42 fast MHC distribution, we do not report preventive effects on iron availability and hepcidin  
43 upregulation. All together, these results highlight that reduction of iron availability persists  
44 durably during simulated microgravity, and that related hepcidin upregulation is not a transient  
45 adaptation to this condition. They also support that skeletal muscle does not necessary play a  
46 key role on iron misdistribution occurring during simulated microgravity.

47 **NEW & NOTEWORTHY.** Microgravity is recognized to induce skeletal muscle wasting and  
48 iron misdistribution both in astronauts and bedridden patients. Based on previous data, we  
49 hypothesized that atrophied skeletal muscle could be involved in microgravity-induced iron  
50 misdistribution by modulating hepcidin expression, the masterkeeper of iron metabolism. Our  
51 data support that hepcidin upregulation is not a transient adaptation associated to microgravity,  
52 but that the underlying mechanisms differ depending on the time to exposure. Despite effective  
53 prevention of soleus wasting by intermittent reloading, we do not report benefits on  
54 microgravity-induced iron misdistribution suggesting that skeletal muscle finally would not be  
55 necessary a key player in this phenomenon.

## 56 INTRODUCTION

57 Astronauts experience decrease in physical function during spaceflight leading to reduce work  
58 capacity, ability to carry out missions and complications during recovery. Lack of muscle  
59 activity due to microgravity considerably contributes to this functional decline by causing  
60 reductions in muscle mass and strength, cardiovascular performance, bone mineral density and  
61 anemia (9, 22, 23). Lack of muscle activity also causes iron misdistribution in astronauts and  
62 bedridden subjects by promoting iron storage to the detriment of iron availability in blood  
63 compartment (28, 37, 38). These alterations in iron metabolism could play a key role in anemia  
64 due to low iron availability for erythropoiesis, but also in muscle atrophy and osteoporosis,  
65 since iron accumulation is well identified to promote oxidative stress by Fenton reaction in  
66 these organs (26, 30).

67 Iron metabolism is mainly controlled by hepcidin, a 25 amino-acid peptide hormone secreted  
68 by the liver that inhibits iron export through the degradation of the iron exporter, ferroportin  
69 (35). In addition, hepcidin reduces iron absorption by the duodenal enterocytes. Consequently,  
70 hepcidin induces both a decrease of blood iron availability and an increase of iron store in cells  
71 expressing ferroportin (i.e., macrophages and enterocytes). Even if previous studies observed  
72 that astronauts and bedridden subjects exhibit higher serum ferritin levels indicative of  
73 increased body iron storage (19, 28, 38), the organs where iron accumulates remain unclear.  
74 Using hindlimb unloading (HU) model to simulate microgravity in rats, our research group  
75 recently reported that short-term exposure to HU (i.e. 7 days) decreases transferrin saturation  
76 and concomitantly increases iron concentrations in spleen, but not in liver (3). Interestingly,  
77 these results were associated to an elevation of hepcidin synthesis in the liver (3), supporting  
78 that this hormone could play a key role in iron misdistribution occurring with microgravity.

79 Hepcidin is mainly upregulated in response to: 1) liver iron accumulation which activates the  
80 bone morphogenetic protein/SMAD (BMP/SMAD) signaling pathway; 2) inflammatory state  
81 which activates the interleukin-6 janus kinase 2/Signal transducer and activator of transcription  
82 3 (IL-6/JAK2/STAT3) signaling pathway; 3) increase of transferrin bound iron which activates  
83 the extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2)(25, 36). After 7 days of HU, we also  
84 observed an increase of STAT3 activation in the liver combined to an elevation of IL-6 mRNA  
85 levels in atrophied skeletal muscle (3). All together, these data suggest that inflammation causes  
86 hepcidin synthesis during the first days of microgravity, but also questions about the transient  
87 or permanent nature of this physiological response to microgravity. Moreover, these data

88 suggest that crosstalk between atrophied skeletal muscle and liver may occur to regulate iron  
89 metabolism during short-term exposure to microgravity. Interestingly, intermittent muscle  
90 reloading (IR) during hindlimb unloading is considered as an efficient strategy in rodents to  
91 limit muscle mass loss, reduction in fiber CSA and muscle strength (1, 7, 8, 14, 29). By affecting  
92 muscle plasticity, this experimental model constitutes an interesting tool to explore the role of  
93 skeletal muscle on the regulation of iron metabolism during simulated microgravity.

94 Therefore, the aim of this study was to determine 1) whether long-term exposure to hindlimb  
95 unloading affect iron distribution and hepcidin synthesis, and 2) if intermittent reloading  
96 (1h/day) by targeting skeletal muscle atrophy constitutes an efficient countermeasure to limit  
97 iron misdistribution occurring during hindlimb unloading.

## 98 **MATERIAL AND METHODS**

### 99 **Ethical approval**

100 The protocol and procedure used in this study were in accordance with the local committee on  
101 Ethics in Research of Rennes (authorization 8585-2017011709503125) and approved by the  
102 French Ministry of Higher Education.

### 103 **Animals and experimental procedures**

104 36 young male Wistar rats (7 weeks-old; Janvier Labs, Le Genest St Isle, France) were housed  
105 in a temperature-controlled room ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) with a 12-h:12-h light/dark cycle and received  
106 standard rodent chow and water *ad libitum*. After 1 week of acclimatization, these animals were  
107 randomly assigned to three experimental groups: non-suspended (control, n = 12), hindlimb  
108 unloaded (HU, n = 12) and hindlimb unloaded with 1h per day of reloading (HU-IR, n=12).  
109 Hindlimb unloading was performed by using Morey's tail-suspension model (18). After 14  
110 days, rats were deeply anaesthetized with a ketamine-xylazine-butorphanol cocktail. Liver,  
111 spleen, soleus and gastrocnemius were harvested, weighed, frozen in liquid nitrogen or fixed  
112 in 4%-paraformaldehyde (PFA). Intracardiac blood was collected into dry tubes. Hemoglobin  
113 concentration was determined using HemoCue® 201+ system (HemoCue, AB, Meaux,  
114 France). Blood was then centrifuged (1,500 g, 10 min) for serum sampling. Rats were  
115 euthanized via exsanguination of the heart.

### 116 **Biochemical methods**

117 Serum iron and unsaturated iron-binding capacity (UIBC) were measured in the biochemistry  
118 laboratory of Rennes Pontchaillou Hospital on Cobas 8000 analyzer Roche® (Cobas® reagents

119 03183696 122 and 04536355 190, respectively, Roche Diagnostics, Meylan, France). Serum  
120 transferrin saturation was calculated as  $[\text{serum iron}/(\text{serum iron} + \text{UIBC})] \times 100$ . Liver, spleen  
121 and gastrocnemius iron concentrations were quantified by ICP-MS as previously described (4).  
122 Serum EPO and IL-6 concentrations were measured by enzyme-linked immunosorbent assay  
123 (ELISA) according to manufacturer's instructions (BioLegend, London, UK).

#### 124 **Histological analyses**

125 Soleus muscles were PFA fixed and paraffin embedded in blocks for 24 hours. Serial transverse  
126 sections of 4 $\mu$ m were obtained from each sample using a LEICA microtome and were mounted  
127 on glass slides, three cuts in each. The muscle cuts were performed in the wider part of the  
128 soleus muscle. Subsequently, the muscle sections were stained using the Gomori method for  
129 the reticulin stain. All the histological sections were scanned (x20 objective) to measure fiber  
130 cross sectional area (CSA) using the Image J software (NIH, Bethesda, MD). Fiber CSA for  
131 each muscle was determined from at least 1000 fibers per muscle.

#### 132 **Protein extraction**

133 Protein extraction was performed from soleus and liver in cold lysis buffer containing 10.0 mM  
134 Tris·HCl, pH 7.4, 0.5M sucrose, 50.0 mM NaCl, 5.0 mM EDTA, 30.0 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1% NP-  
135 40, 0.25% sodium deoxycholate, 50.0 mM NaF, 100.0 $\mu$ M sodium orthovanadate, and protease  
136 inhibitor cocktail (5 $\mu$ l/ml, P8340; Sigma, St. Louis, MO). The samples were homogenized  
137 using a Polytron homogenizer at 4°C. Each sample was then incubated on ice for 30 min  
138 followed by 3x10 s of sonication. The homogenates were transferred to microcentrifuge tubes  
139 and centrifuged at 12,000g for 12 min at 4°C. The protein concentration of the supernatant was  
140 determined by a Lowry assay using bovine serum albumin as a standard. Samples were then  
141 diluted in SDS-PAGE sample buffer (50 mM Tris·HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5%  $\beta$ -  
142 mercaptoethanol, and 0.1% bromophenol blue) and heated 5 min at 95°C until analyses.

#### 143 **Western Blotting**

144 Samples containing 50-100 $\mu$ g of proteins were resolved on 12.5% SDS-PAGE. The proteins  
145 were transferred at 240 mA for 90 min onto a 0.2 $\mu$ m nitrocellulose membrane. Membranes  
146 were blocked with 5% BSA or nonfat dry milk in Tris-buffered saline/0.05% Tween-20  
147 (TBST) for 1 hour at room temperature. Membranes were incubated overnight at 4°C with  
148 appropriate primary antibodies (Tab. 1). Thereafter, membranes were washed with TBST and  
149 incubated for 1 hour at room temperature with infrared dye-conjugated secondary antibodies  
150 (LI-COR, Lincoln, NE). After being washed, blots were captured using the Odyssey Imaging

151 System (LI-COR). All blots were scanned, and densitometric analysis of the bands was  
152 conducted using GS-800 imaging densitometer and Quantity One software. Phospho-specific  
153 signal was normalized to the total signal to estimate the ratio of activated marker.

#### 154 **MHC distribution**

155 The muscle fiber phenotype was determined by assessing the presence of the different myosin  
156 heavy chain (MHC) isoforms (slow MHC I and fast MHC IIa, IId/x, IIb isoforms), as  
157 previously described (10, 21). Protein samples (6  $\mu$ g) were separated on high-glycerol-  
158 containing (30%) gels with an acrylamide-to-bis-acrylamide ratio of 50:1 for the separating gel  
159 (8% total acrylamide, pH 8.8) and for the stacking gel (4% total acrylamide, pH 6.8) using a  
160 Mini-Protean II dual slab cell apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA). After electrophoresis (at  
161 140V in a refrigerated room at 4°C for 22h), gels were stained with Coomassie blue (IRDye®  
162 Blue Protein Stain, LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) and the different MHC isoforms  
163 were identified according to their electrophoretic mobility pattern (10, 21).

#### 164 **RNA extraction and quantitative real-time PCR**

165 Total RNA extraction from liver (~30 mg) and soleus (~15 mg) was done with Trizol®  
166 (Invitrogen, Vilvoorde, Belgium), according to the manufacturer's instructions. The RNA  
167 quality and quantity were assessed by 1.5% agarose gel electrophoresis and Nanodrop®  
168 spectrophotometry. Reverse transcription was performed with iScript cDNA synthesis kit (Bio-  
169 Rad) from 1  $\mu$ g total RNA. Real time PCR experiments were done on a MyIQ2 thermocycler  
170 (Bio-Rad) using the following conditions: 3 min at 95°C, followed by 35 cycles of 30 s at 95°C,  
171 30 s at 60°C and 30 s at 72°C. Samples were analyzed in duplicate in 10  $\mu$ l reaction volume  
172 containing 4.8  $\mu$ l IQSybrGreen SuperMix (Bio-Rad), 0.1  $\mu$ l of each primer (100 nM final) and  
173 5  $\mu$ l cDNA. Primers sequences are reported in Table 2. Melting curves were systematically  
174 analyzed to ensure the specificity of the amplification process. Target genes were normalized  
175 using three reference genes according to geNorm analysis (31) and finally expressed relatively  
176 to the control group. The references genes were ribosomal protein L4 (*Rpl4*), Glyceraldehyde-  
177 3-Phosphate Dehydrogenase (*Gapdh*) and hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt1*).

#### 178 **Statistical analysis**

179 All data are presented as the mean  $\pm$  SEM. The normality of each distribution and homogeneity  
180 of variance were assessed with the Kolmogorov-Smirnov and Bartlett test, respectively. A one-  
181 way analysis of variance (ANOVA) was then performed. Significant interactions effects were  
182 analyzed with the Fischer LSD post-hoc test. The Kruskal Wallis test was chosen when the

183 normality and/or equal variance test failed. For all statistical analyses, the significance level  
184 was set at 0.05. Data were analyzed using the statistical package GraphPad Prism version 6.02  
185 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, California).

## 186 **RESULTS**

187 *Intermittent reloading prevents HU-induced soleus atrophy.* Body weight (BW) and muscle  
188 weight-to-BW ratio are shown in Table 3. After 14 days of HU, both soleus and gastrocnemius  
189 weight are respectively 46% and 19% lower in HU compared to control rats ( $p < 0.001$  for both  
190 groups, Tab. 3). The reduction of soleus muscle mass is associated with a lower mean fiber  
191 CSA in HU compared to control group (-62%,  $p < 0.001$ , Fig. 1A and C). Intermittent reloading  
192 partially prevents reduction of soleus muscle mass and fiber CSA with higher values in HU-IR  
193 compared to HU group (+36%,  $p < 0.001$  and +58%,  $p < 0.001$  respectively, Tab. 3 and Fig. 1A  
194 and C). Gastrocnemius mass remains unchanged between HU and HU-IR groups (Tab. 3).

195 Microgravity-induced atrophy is associated with an imbalance between muscle protein  
196 synthesis and muscle protein breakdown (5). These alterations of protein turnover is generally  
197 characterized by a decrease of the anabolic Akt/mTOR signaling pathway combined to an  
198 increase of catabolic ubiquitin-proteasome pathway (5). Figures 1E-F show representative  
199 Western blot and relative content of phosphorylated/whole expression levels of key markers of  
200 these signaling pathways. We observe a decrease of Akt activation and an increase of 4E-PB1  
201 activation in soleus of HU compared to control group (-28%,  $p = 0.054$  and +29%,  $p < 0.001$ ,  
202 respectively, Fig. 1E-F). These results are associated to an increase of protein ubiquitination  
203 after 14 days of HU (+21%,  $p = 0.012$ , Fig. 1E-F). Intermittent reloading prevents Akt activation  
204 and protein ubiquitination with not significant differences between control and HU-IR animals  
205 (Fig 1E-F). However, 4E-PB1 activation remains significantly higher in HU-IR compared to  
206 control animals (+15%,  $p < 0.001$ , Fig. 1E-F).

207 *Intermittent reloading prevents slow-to-fast MHC phenotype transition in soleus muscle.*  
208 Figure 1B presents relative contents and representative SDS-PAGE of the fast and slow MHC  
209 isoforms for all experimental groups. Type I slow myosin heavy chain (MHC I), the  
210 predominant form in soleus of control groups (90%), is significantly lower expressed in HU  
211 group (76%,  $p = 0.002$ , Fig. 1B and D). This reduction occurs in favor of a significant increase  
212 of MHC IIx (from 1 to 7%,  $p < 0.001$ , Fig. 1B and D) and MHC IIb (from 1 to 6%,  $p < 0.001$ ,  
213 Fig. 1B and D). MHC IIa does not significantly differ between control and HU groups ( $p = 0.32$ ,  
214 Fig. 1B and D). HU-IR group exhibits similar decrease of MHC I expression compared to

215 control group (90 vs. 78%,  $p=0.004$ , Fig. 1B and D), but this reduction occurs in favor of a  
216 significant increase of MHC IIa (from 7 to 17%,  $p=0.003$ , Fig. 1B and D). Interestingly,  
217 intermittent reloading efficiently prevents the increase of MHC IIx and MHC IIb observed in  
218 HU group (from 7 to 2%,  $p<0.001$  and from 6 to 2%,  $p<0.001$  respectively, Fig. 1B and D).

219 *Effects of 14 days of hindlimb unloading and intermittent reloading on iron distribution.* We  
220 aimed to check the disruption of iron metabolism induced by HU, and whether intermittent  
221 reloading can affect it. These results are presented in Table 4. After 14 days, both serum iron  
222 concentrations (-21%,  $p=0.019$ , Tab. 4) and transferrin saturation (-18%,  $p=0.041$ , Tab. 4) are  
223 significantly reduced in HU compared to control group. This reduction of available iron is not  
224 associated with changes in hemoglobin, hematocrit and serum EPO levels (Tab. 4). To localize  
225 where iron misdistribution could occur during HU, we measured iron concentration in liver  
226 and spleen, the main organs responsible for iron storage. Here, we report no difference between  
227 control and HU groups both in liver and spleen. Since muscle atrophy could affect iron  
228 metabolism, we also measured iron concentrations in skeletal muscle and do not observe any  
229 change in gastrocnemius iron concentrations after 14 days of HU. Despite benefits on soleus  
230 muscle atrophy, iron availability is also reduced in HU+IR as displayed by the declining trend  
231 of transferrin saturation compared to control group (-15%,  $p=0.08$ , Tab. 4). However, serum  
232 iron concentration does not differ between control and HU-IR groups. Similarly, HU-IR does  
233 not affect iron concentrations in liver, spleen and skeletal muscle. Finally, hemoglobin,  
234 hematocrit and serum EPO levels remain unchanged in HU-IR groups (Tab. 4).

235 *Effects of 14 days of hindlimb unloading and intermittent reloading on hepcidin regulation.* To  
236 investigate the mechanism by which HU affects available iron, we measured in liver the  
237 expression of hepcidin, the master regulator of iron metabolism. We observe that HU increases  
238 *Hepcidin* mRNA level (+77%, p=0.036, Fig. 2A), supporting thereby a role of this hormone in  
239 the alteration of iron homeostasis occurring in HU animals. In accordance with the lack of  
240 preventive effects of HU-IR on reduction of available iron, *Hepcidin* mRNA level also  
241 increases in HU-IR group compared to control group (+95%, p=0.008, Fig. 2A). Hepcidin  
242 expression is known to be upregulated by different signaling pathways including  
243 BMP6/SMAD, ERK1/2 and IL-6 /STAT3 (52). Therefore, we investigated whether these three  
244 signaling pathways were activated in the liver of HU animals. However, we do not notice any  
245 change in activation of STAT3, SMAD1-5-8 and ERK (Fig. 2B-C). Furthermore, hepatic  
246 mRNA expression of *Crp* and *Haptoglobin* remain unchanged in HU and HU-IR groups.

## 247 **DISCUSSION**

248 The present study was designed to evaluate the long-term effect of microgravity on iron  
249 metabolism, and determine the role of skeletal muscle on iron metabolism regulation in this  
250 specific condition. Using HU model on rats, we previously demonstrated that 7 days of  
251 exposure caused hepcidin upregulation and concomitant iron misdistribution (3). In the present  
252 study, we demonstrated that iron availability remains reduced after 14 days of HU probably  
253 due to a persistent hepcidin upregulation. Interestingly, we observed that intermittent reloading  
254 efficiently prevents HU-induced soleus atrophy and slow-to fast twitch MHC transition.  
255 However, this countermeasure fails to prevent reduction of iron availability and hepcidin  
256 upregulation.

257 As observed during space missions, microgravity reduces serum iron concentrations and  
258 increases iron storage in humans (28). HU model is widely used since decades to mimic the  
259 effects of microgravity on the organism during spaceflight. This model presents the advantage  
260 of exploring the organ-specific responses to microgravity, a key characteristic of spaceflight  
261 environment, and excludes the concomitant effects of astronaut's exposure to radiation or  
262 hyperoxia. In a previous study, we found that 7 days of HU reduced circulating iron and  
263 transferrin saturation in rats (3). Here, after 14 days of HU, we also observed a reduction of  
264 serum iron concentration and transferrin saturation suggesting that reduction of available iron  
265 is still effective when exposure to microgravity is prolonged. Such reduction of iron available  
266 for erythropoiesis could play an important role in spaceflight anemia (27). Similarly to short-

267 term exposure to microgravity in humans (13, 16), we observed that 7 days of HU reduced  
268 serum EPO concentrations in rats (data unpublished). However, we observed in the present  
269 study that serum EPO concentrations do not differ between control and HU groups after 14  
270 days suggesting that reduction of erythropoiesis play probably a role in anemia only during the  
271 first days of exposure to microgravity.

272 To understand whether iron metabolism is dysregulated under microgravity, we explored  
273 hepcidin synthesis and related mechanisms of regulation in the liver of HU rats. Here, hepcidin  
274 transcription was increased in unloaded rats after 14 days in the same magnitude that previously  
275 observed after 7 days of HU (3). High levels of hepcidin induce both a decrease of serum iron  
276 and an increase of iron store in cells expressing ferroportin, especially macrophages (12). After  
277 7 days of HU, we previously observed that iron storage occurred in spleen, particularly rich in  
278 macrophages (3). If in this previous study, liver was preserved of iron accumulation during the  
279 first days of HU, Xu *et al.* reported that 21 days of HU increases iron concentration in this  
280 organ (33). After 14 days of HU, we report in the present study that iron did not accumulate  
281 anymore in spleen, and that liver does not yet exhibit increased iron concentrations. These  
282 results suggest that splenic iron storage occurring during the first days of hindlimb unloading  
283 is transient, maybe to protect other organs from iron overload. However, this mechanism would  
284 not be effective when exposure to mechanical unloading is prolonged. The fact that iron  
285 availability remains reduced in blood compartment despite the return to normal iron store in  
286 spleen also suggest that iron could start to accumulate in other organs when the organism  
287 remain exposed to microgravity. For these reasons, we also measured iron concentrations in  
288 atrophied skeletal muscle (i.e. gastrocnemius), and observed that the latter remains unchanged  
289 after 14 days of HU. To go further, it will be interesting in future studies to explore the effects  
290 of prolonged microgravity on iron storage in other organs functionally impacted in this  
291 condition (e.g. brain, kidney, heart).

292 The BMP/SMAD signaling pathway is the main positive regulator of hepcidin (36). More  
293 specifically, both increase in transferrin saturation and liver iron content promote BMP/SMAD  
294 activation (6). In addition to the BMP/SMAD pathway, evidences from *in vitro* studies and  
295 TrF2/Hfe null mice support that the ERK1/2 signaling pathway is a positive regulator of  
296 hepcidin (24, 25). Finally, inflammation through the inflammatory cytokine IL-6 is well known  
297 to activate the transcription factor STAT3 which in turn promotes hepcidin production (32).  
298 Interestingly, we previously showed in rats that 7 days of HU increases STAT3 activation in  
299 the liver (3). In the present study, we observe that this activation is no longer present after 14

300 days of HU, whereas both BMP/SMAD and ERK1/2 signaling pathways remain unchanged.  
301 Recently, Xu et al (33). observed in mice an increase of BMP6 mRNA levels combined to  
302 hepcidin upregulation after 21 days of HU, suggesting that BMP/SMAD signaling pathway  
303 plays probably a key role in hepcidin synthesis when exposure to mechanical unloading is  
304 prolonged and iron overload starts to occur in the liver. Altogether, those data support that  
305 hepcidin upregulation is not a transient adaptation associated to mechanical unloading, but that  
306 the underlying mechanisms differ depending on the time to exposure. Thus, low-grade  
307 inflammatory state play probably a key role during the first days of microgravity, but if  
308 exposure is prolonged other mechanisms would take over including among other liver iron  
309 overload.

310 We previously observed that 7 days of HU increase IL-6 mRNA levels in atrophied skeletal  
311 muscle, and thus concomitantly to STAT3 activation in the liver (3). This phenomenon led us  
312 to suggest a crosstalk between skeletal muscle and liver in regulation of iron metabolism under  
313 microgravity. As mechanical unloading increases both circulating and muscle IL-6 levels in  
314 humans and rodents (2, 3, 11, 15, 20, 34), we hypothesized that intermittent reloading would  
315 prevent hepcidin upregulation and related iron misdistribution by limiting muscle atrophy and  
316 associated inflammatory state. Here, we do not report any preventive effect on iron metabolism  
317 in the present study, although intermittent reconditioning is effective to limit HU-induced  
318 soleus muscle atrophy and slow-to fast contractile phenotype transition. Such results refute the  
319 hypothesis of a dialogue between atrophied skeletal muscle and hepatic hepcidin synthesis  
320 under mechanical unloading. However, if intermittent reconditioning is effective to act on  
321 soleus muscle atrophy, this countermeasure fails to prevent gastrocnemius muscle mass loss in  
322 the present study. This muscle represents alone a mass approximately 20 times bigger than  
323 soleus in rats. Thus, we cannot exclude that the proposed countermeasure exerts a too limited  
324 preventive effect on all the atrophied skeletal muscles to act on the regulation of the iron  
325 metabolism. Moreover, after 14 days of HU, the IL-6/STAT3 signaling pathway is no longer  
326 activated in the liver, and this independently of intermittent reloading. We cannot also exclude  
327 the hypothesis that intermittent reconditioning could exert a preventive effect on hepcidin  
328 synthesis during the first days of mechanical unloading, characterized by an intense catabolic  
329 and inflammatory state in skeletal muscle; this effect would then attenuate after 14 days  
330 following the progressive reduction of the systemic and muscle inflammatory state.

331 To conclude, the present study demonstrates in rats that reduction of iron availability durably  
332 persists during simulated microgravity, but that iron misdistribution differ after short and long-

333 term exposure. We confirm in this study that hepcidin play a key role on this process even if  
334 the related mechanisms of regulation still remain unclear. Despite effective prevention of  
335 soleus wasting by intermittent reloading, we do not report benefits on microgravity-induced  
336 iron misdistribution suggesting that skeletal muscle finally would not be necessary a key player  
337 in this phenomenon.

### 338 **ACKNOWLEDGMENTS**

339 The authors thank Pascale Bellaud (H2P2 platform, University Rennes 1, Rennes) for technical  
340 help in histological analyses, and Guillemette Gauquelin-Koch (Centre National d'Etudes  
341 Spatiales, Paris) for scientific support.

### 342 **GRANTS**

343 This study was supported by grants from the French “Centre National d'Etudes Spatiales”  
344 (CNES), the Brittany Research Council and INRA.

### 345 **DISCLOSURES**

346 No conflict of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

### 347 **REFERENCES**

- 348 1. **Bangart JJ, Widrick JJ, Fitts RH.** Effect of intermittent weight bearing on soleus  
349 fiber force-velocity-power and force-pCa relationships. *J Appl Physiol* 82: 1905–1910,  
350 1997.
- 351 2. **Bosutti A, Malaponte G, Zanetti M, Castellino P, Heer M, Guarnieri G, Biolo G.**  
352 Calorie restriction modulates inactivity-induced changes in the inflammatory markers  
353 C-reactive protein and pentraxin-3. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 3226–3229, 2008.
- 354 3. **Cavey T, Pierre N, Nay K, Allain C, Ropert M, Loréal O, Derbré F.** Simulated  
355 microgravity decreases circulating iron in rats: role of inflammation-induced hepcidin  
356 upregulation. *Exp Physiol* 102: 291–298, 2017.
- 357 4. **Cavey T, Ropert M, de Tayrac M, Bardou-Jacquet E, Island M-L, Leroyer P,**  
358 **Bendavid C, Brissot P, Loréal O.** Mouse genetic background impacts both on iron and  
359 non-iron metals parameters and on their relationships. *Biometals* 28: 733–743, 2015.
- 360 5. **Chopard A, Hillock S, Jasmin BJ.** Molecular events and signalling pathways involved  
361 in skeletal muscle disuse-induced atrophy and the impact of countermeasures. *J Cell*  
362 *Mol Med* 13: 3032–3050, 2009.
- 363 6. **Core AB, Canali S, Babitt JL.** Hemojuvelin and bone morphogenetic protein (BMP)  
364 signaling in iron homeostasis. *Front Pharmacol* 5: 104, 2014.

- 365 7. **D'Aunno DS, Robinson RR, Smith GS, Thomason DB, Booth FW.** Intermittent  
366 acceleration as a countermeasure to soleus muscle atrophy. *J Appl Physiol* 72: 428–433,  
367 1992.
- 368 8. **D'Aunno DS, Thomason DB, Booth FW.** Centrifugal intensity and duration as  
369 countermeasures to soleus muscle atrophy. *J Appl Physiol* 69: 1387–1389, 1990.
- 370 9. **De Santo NG, Cirillo M, Kirsch KA, Correale G, Drummer C, Frassl W, Perna**  
371 **AF, Di Stazio E, Bellini L, Gunga H-C.** Anemia and erythropoietin in space flights.  
372 *Semin Nephrol* 25: 379–387, 2005.
- 373 10. **Derbré F, Droguet M, Léon K, Troadec S, Pennec J-P, Giroux-Metges M-A,**  
374 **Rannou F.** Single Muscle Immobilization Decreases Single-Fibre Myosin Heavy Chain  
375 Polymorphism: Possible Involvement of p38 and JNK MAP Kinases. *PLoS ONE* 11:  
376 e0158630, 2016.
- 377 11. **Felix K, Wise K, Manna S, Yamauchi K, Wilson BL, Thomas RL, Kulkarni A,**  
378 **Pellis NR, Ramesh GT.** Altered cytokine expression in tissues of mice subjected to  
379 simulated microgravity. *Mol Cell Biochem* 266: 79–85, 2004.
- 380 12. **Ganz T.** Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood* 117: 4425–4433, 2011.
- 381 13. **Gunga HC, Kirsch K, Baartz F, Maillet A, Gharib C, Nalishiti W, Rich I, Röcker**  
382 **L.** Erythropoietin under real and simulated microgravity conditions in humans. *J Appl*  
383 *Physiol* 81: 761–773, 1996.
- 384 14. **Hauschka EO, Roy RR, Edgerton VR.** Periodic weight support effects on rat soleus  
385 fibers after hindlimb suspension. *J Appl Physiol* 65: 1231–1237, 1988.
- 386 15. **Kwon OS, Tanner RE, Barrows KM, Runtsch M, Symons JD, Jalili T, Bikman BT,**  
387 **McClain DA, O'Connell RM, Drummond MJ.** MyD88 regulates physical inactivity-  
388 induced skeletal muscle inflammation, ceramide biosynthesis signaling, and glucose  
389 intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 309: E11-21, 2015.
- 390 16. **Leach CS, Johnson PC, Cintrón NM.** The endocrine system in space flight. *Acta*  
391 *Astronaut* 17: 161–166, 1988.
- 392 17. **Miyazaki M, Noguchi M, Takemasa T.** Intermittent Reloading Attenuates Muscle  
393 Atrophy through Modulating Akt/mTOR Pathway. *Medicine & Science in Sports &*  
394 *Exercise* 40: 848–855, 2008.
- 395 18. **Morey-Holton ER, Globus RK.** Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J*  
396 *Appl Physiol* 92: 1367–1377, 2002.
- 397 19. **Morgan JLL, Zwart SR, Heer M, Ploutz-Snyder R, Ericson K, Smith SM.** Bone  
398 metabolism and nutritional status during 30-day head-down-tilt bed rest. *J Appl Physiol*  
399 113: 1519–1529, 2012.
- 400 20. **Mutin-Carnino M, Carnino A, Roffino S, Chopard A.** Effect of muscle unloading,  
401 reloading and exercise on inflammation during a head-down bed rest. *Int J Sports Med*  
402 35: 28–34, 2014.

- 403 21. **Nay K, Jollet M, Goustard B, Baati N, Vernus B, Pontones M, Lefeuvre-Orfila L,**  
404 **Bendavid C, Rué O, Mariadassou M, Bonniou A, Ollendorf V, Lepage P, Derbré F,**  
405 **Koechlin-Ramonatxo C.** Gut bacteria are critical for optimal muscle function: a  
406 potential link with glucose homeostasis. *Am J Physiol End Meta* [in revision], 2019.
- 407 22. **Pavy-Le Traon A, Heer M, Narici MV, Rittweger J, Vernikos J.** From space to  
408 Earth: advances in human physiology from 20 years of bed rest studies (1986-2006).  
409 *Eur J Appl Physiol* 101: 143–194, 2007.
- 410 23. **Pierre N, Appriou Z, Gratas-Delamarche A, Derbré F.** From physical inactivity to  
411 immobilization: Dissecting the role of oxidative stress in skeletal muscle insulin  
412 resistance and atrophy. *Free Radic Biol Med* 98: 197–207, 2016.
- 413 24. **Poli M, Lusciati S, Gandini V, Maccarinelli F, Finazzi D, Silvestri L, Roetto A,**  
414 **Arosio P.** Transferrin receptor 2 and HFE regulate furin expression via mitogen-  
415 activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/Erk) signaling.  
416 Implications for transferrin-dependent hepcidin regulation. *Haematologica* 95: 1832–  
417 1840, 2010.
- 418 25. **Ramey G, Deschemin J-C, Vaulont S.** Cross-talk between the mitogen activated  
419 protein kinase and bone morphogenetic protein/hemojuvelin pathways is required for  
420 the induction of hepcidin by holotransferrin in primary mouse hepatocytes.  
421 *Haematologica* 94: 765–772, 2009.
- 422 26. **Reardon TF, Allen DG.** Iron injections in mice increase skeletal muscle iron content,  
423 induce oxidative stress and reduce exercise performance. *Exp Physiol* 94: 720–730,  
424 2009.
- 425 27. **Smith SM.** Red blood cell and iron metabolism during space flight. *Nutrition* 18: 864–  
426 866, 2002.
- 427 28. **Smith SM, Zwart SR, Block G, Rice BL, Davis-Street JE.** The nutritional status of  
428 astronauts is altered after long-term space flight aboard the International Space Station.  
429 *J Nutr* 135: 437–443, 2005.
- 430 29. **Thomason DB, Herrick RE, Baldwin KM.** Activity influences on soleus muscle  
431 myosin during rodent hindlimb suspension. *J Appl Physiol* 63: 138–144, 1987.
- 432 30. **Tsay J, Yang Z, Ross FP, Cunningham-Rundles S, Lin H, Coleman R, Mayer-**  
433 **Kuckuk P, Doty SB, Grady RW, Giardina PJ, Boskey AL, Vogiatzi MG.** Bone loss  
434 caused by iron overload in a murine model: importance of oxidative stress. *Blood* 116:  
435 2582–2589, 2010.
- 436 31. **Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A,**  
437 **Speleman F.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by  
438 geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:  
439 RESEARCH0034, 2002.
- 440 32. **Wrighting DM, Andrews NC.** Interleukin-6 induces hepcidin expression through  
441 STAT3. *Blood* 108: 3204–3209, 2006.

- 442 33. **Xu Z, Sun W, Li Y, Ling S, Zhao C, Zhong G, Zhao D, Song J, Song H, Li J, You**  
443 **L, Nie G, Chang Y, Li Y.** The regulation of iron metabolism by hepcidin contributes to  
444 unloading-induced bone loss. *Bone* 94: 152–161, 2017.
- 445 34. **Yakabe M, Ogawa S, Ota H, Iijima K, Eto M, Ouchi Y, Akishita M.** Inhibition of  
446 interleukin-6 decreases atrogene expression and ameliorates tail suspension-induced  
447 skeletal muscle atrophy. *PLoS One* 13, 2018.
- 448 35. **Zhang A-S.** Control of Systemic Iron Homeostasis by the Hemojuvelin-Hepcidin  
449 Axis12. *Adv Nutr* 1: 38–45, 2010.
- 450 36. **Zhao N, Zhang A-S, Enns CA.** Iron regulation by hepcidin. *J Clin Invest* 123: 2337–  
451 2343, 2013.
- 452 37. **Zwart SR, Crawford GE, Gillman PL, Kala G, Rodgers AS, Rogers A, Inniss AM,**  
453 **Rice BL, Ericson K, Coburn S, Bourbeau Y, Hudson E, Mathew G, DeKerlegand**  
454 **DE, Sams CF, Heer MA, Paloski WH, Smith SM.** Effects of 21 days of bed rest, with  
455 or without artificial gravity, on nutritional status of humans. *J Appl Physiol (1985)* 107:  
456 54–62, 2009.
- 457 38. **Zwart SR, Morgan JLL, Smith SM.** Iron status and its relations with oxidative  
458 damage and bone loss during long-duration space flight on the International Space  
459 Station. *Am J Clin Nutr* 98: 217–223, 2013.

460

461

462 **TABLES**

463

464 **Table 1:** List of primary antibodies used for Western Blotting

<b>Antibody</b>	<b>Molecular Weight (kDa)</b>	<b>Reference</b>	<b>Dilution</b>
p-4E-BP1 <sup>Thr37/46</sup>	15 to 20	Cell Signaling, 2855	1:1000
4E-BP1	15 to 20	Cell Signaling, 9644	1:1000
p-AKT <sup>Ser473</sup>	60	Cell Signaling, 9271	1:1000
AKT	60	Cell Signaling, 9272	1:1000
p-ERK <sup>Thr202/Tyr204</sup>	40	Cell Signaling, 9101	1:1000
HSC70	70	Cell Signaling, 9271	1:5000
p-SMAD1/5/8 <sup>Ser463/465</sup>	60	Abcam, ab92698	1:1000
SMAD5	60	Cell Signaling, 12534	1:1000
p- STAT3 <sup>Tyr705</sup>	90	Cell Signaling, 9131	1:1000
STAT3	86	Cell Signaling, 4904	1:1000
Ubiquitin		Cell Signaling, 3933	1:1000

465

466

467 **Table 2.** Gene expression in liver- Sequences of primers (5'–3')

<b>Primers</b>	<b>Reference</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<i>C-Reactive Protein</i>	NM_017096.3	AGGCTTTTGGTCATGAAGACATG	CTTCGGCTCACATCAGCGT
<i>Gapdh</i>	NM_017008.4	GGTCGGTGTGAACGGATTTG	CGTGGGTAGAGTCATACTGGAACA
<i>Haptoglobin</i>	NM_012582.2	AACACTTGGTTCGTTATCGCTG	CCACACACTGCCTCACACTTG
<i>Hepcidin</i>	NM_053469.1	CTGCAGCCTTGGCATGG	CAGCAGCGCA CTGTCATCA -3
<i>Hprt1</i>	XM_008773659.2	CTGATTATGGACAGGACTGAAAGAC	CCAGCAGGTCAGCAAAGAACT
<i>Rpl4</i>	NM_022510.1	CGAGCACCACGCAAGAAGAT	ATTCCTAGCCTGGCGGAGAA

468

469 **Table 3. Effect of hindlimb unloading (HU) and intermittent reloading on body and organ**  
 470 **weights.** Values are means  $\pm$  SEM. Significant differences ( $P<0.05$ ) are referenced as follows:  
 471 <sup>a</sup>: comparison versus control group, <sup>b</sup>: comparison between HU and HU-IR groups

	Control	HU	HU-IR
Body weight (g)	413.9 $\pm$ 31.2	336.3 $\pm$ 25.4 <sup>a</sup>	351.1 $\pm$ 24.9 <sup>a</sup>
Soleus weight-to-BW ratio (g/100 g)	44.0 $\pm$ 2.2	24.2 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	33.0 $\pm$ 4.8 <sup>a,b</sup>
Gastrocnemius weight-to-BW ratio (g/100 g)	544.3 $\pm$ 36.3	444.9 $\pm$ 43.1 <sup>a</sup>	467.5 $\pm$ 65.3 <sup>a</sup>
Liver weight-to-BW ratio (g/100 g)	3.3 $\pm$ 0.4	3.2 $\pm$ 0.4	3.1 $\pm$ 0.5
Spleen weight-to-BW ratio (g/100 g)	0.25 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.04

472

473

474 **Table 4. Effect of hindlimb unloading and intermittent reloading on iron distribution and**  
 475 **hematological parameters.** Values are the mean  $\pm$  SEM. Significant difference was checked  
 476 using a one-way ANOVA followed by the LSD Fisher post-hoc test and referenced as follows:  
 477 <sup>a</sup> : comparison versus control group ( $p<0.05$ ) ; <sup>c</sup> : comparison between control and HU-IR  
 478 groups ( $p=0.08$ ) (n=9 for each group).

479

	Control	HU	HU-IR
<i>Iron metabolism</i>			
Serum iron concentrations ( $\mu\text{mol/L}$ )	35.7 $\pm$ 2.2	28.2 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	33.9 $\pm$ 2.7
Transferrin Saturation (%)	45.2 $\pm$ 2.5	38.1 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	39.3 $\pm$ 2.7 <sup>c</sup>
Liver iron content ( $\mu\text{g/g}$ )	348.7 $\pm$ 28.4	344.7 $\pm$ 40.4	327.8 $\pm$ 28.5
Spleen iron content ( $\mu\text{g/g}$ )	1578 $\pm$ 152	1808 $\pm$ 134	1523 $\pm$ 157
Gastrocnemius iron content ( $\mu\text{g/g}$ )	53.8 $\pm$ 2.9	56.6 $\pm$ 1.4	59.2 $\pm$ 5.1
<i>Hematology</i>			
Hematocrit (%)	47.5 $\pm$ 0.9	48.5 $\pm$ 0.6	48.0 $\pm$ 0.5
Hemoglobin (g/dL)	17.4 $\pm$ 0.5	17.5 $\pm$ 0.2	17.4 $\pm$ 0.2
EPO (mU/mL)	2.9 $\pm$ 0.3	3.2 $\pm$ 0.4	3.0 $\pm$ 0.2

480

481

482 **FIGURES LEGENDS**

483 **Figure 1: Effect of hindlimb unloading and intermittent reloading on soleus mass and**  
484 **contractile phenotype. Values are the mean  $\pm$  SEM.** (A) Representative cross sectional area  
485 in soleus, (B) Representative electrophoresis of soleus myosin heavy chain isoforms, (C)  
486 Soleus cross sectional area ( $\mu\text{m}^2$ ), (D) Distribution of myosin heavy chains isoforms in soleus  
487 muscle, (E) Akt activation, 4E-BP1 activation and ubiquitin profile in soleus muscle, (F)  
488 representative blot of p-Akt<sup>Ser473</sup>, Akt, p-4E-BP1<sup>Thr37/46</sup>, 4E-BP1 and ubiquitinated proteins.  
489 Significant difference was checked using a one-way ANOVA followed by the LSD Fisher post-  
490 hoc test and referenced as follows: a : comparison versus control group ( $p < 0.05$ ) ; b :  
491 comparison between HU and HU-IR groups ( $p < 0.05$ ) (n=9 for each group) ; \*: robust trend  
492 toward significance between control and HU groups ( $p = 0.054$ ).

493 **Figure 2: Effect of hindlimb unloading and intermittent reloading on liver hepcidin**  
494 **regulation.** Values are the mean  $\pm$  SEM. (A) Hepatic hepcidin, haptoglobin and C-reactive  
495 protein mRNA levels, (B) Hepatic STAT3, SMAD1/5/8, ERK1-2 activations, (C)  
496 Representative blots of phosphorylated and total proteins involved in hepcidin regulation.  
497 Significant difference was checked using a one-way ANOVA followed by the LSD Fisher post-  
498 hoc test and referenced as follows: a : comparison versus control group ( $p < 0.05$ ) ; b :  
499 comparison between HU and HU-IR groups ( $p < 0.05$ ) (n=9 for each group).

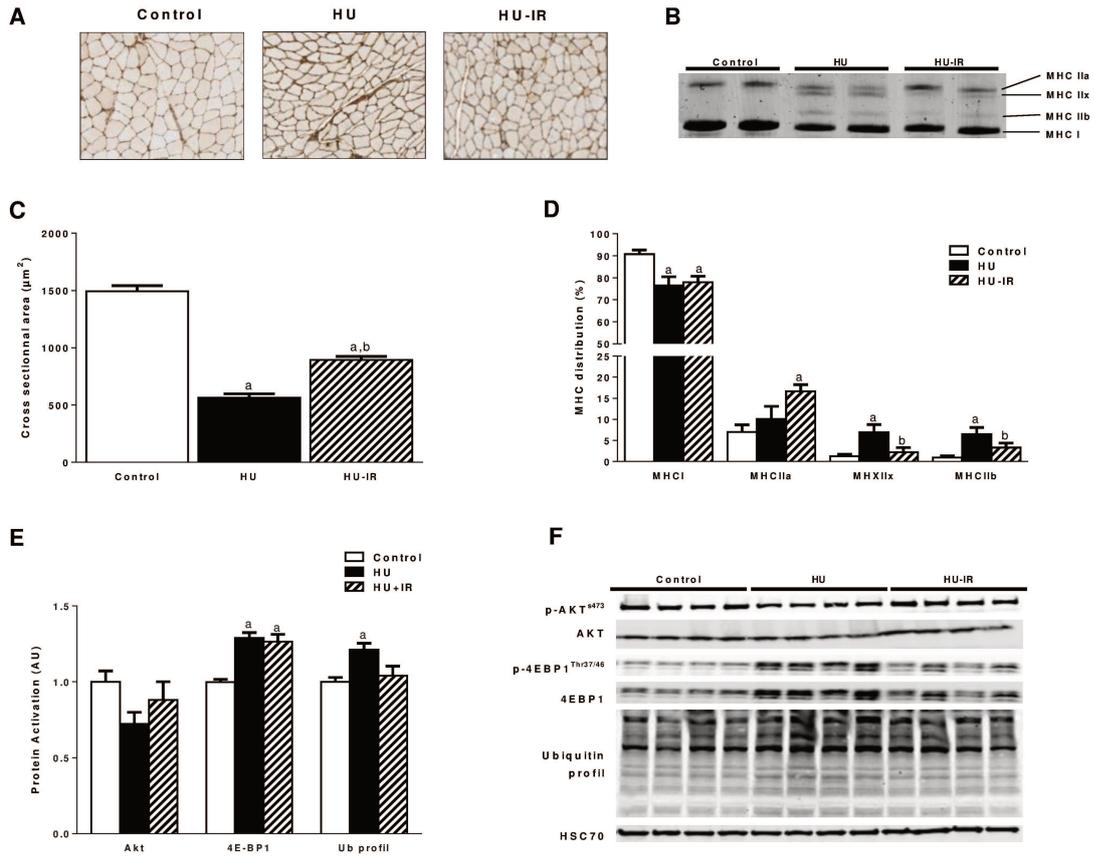


Figure 1

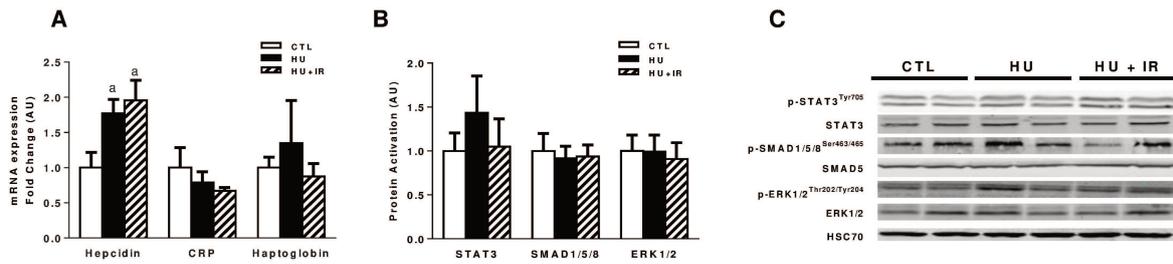


Figure 2

### III. Etude N°3: Les bactéries intestinales sont essentielles à la fonction musculaire : un lien potentiel avec l'homéostasie glucidique.

#### Introduction

Près de  $10^{14}$  bactéries vivent dans notre intestin en symbiose. Ce biosystème est aujourd'hui considéré comme un organe central de l'organisme en raison de son impact pour la santé (Clemente et al., 2012; Janssen and Kersten, 2017). En effet, une modification en terme de richesse, diversité ou composition de ce microbiote (altérations regroupées sous un terme plus générique : la dysbiose) peut être à l'origine, directement ou indirectement, de nombreuses maladies chroniques, comme l'obésité, le diabète de type 1 et 2, les allergies et même l'autisme (Sekirov et al., 2010). Cette responsabilité dans le développement de ces maladies peut s'expliquer par le lien qu'il existerait entre le microbiote et les autres organes tels que le cerveau, le foie ou les poumons (Boursier et al., 2016; Dinan and Cryan, 2017; Schuijt et al., 2016).

Récemment, l'hypothèse d'un dialogue entre le microbiote intestinal et le muscle a émergé dans la littérature scientifique (Bindels and Delzenne, 2013). Par exemple, dans un modèle d'inflammation chronique chez des souris, la restauration de la souche commensale *Escherichia coli* prévient efficacement l'atrophie musculaire (Palaferrri Schieber et al., 2015). De plus, la restauration d'un microbiote sain chez des souris cancéreuses, réduit la prolifération tumorale et la cachexie musculaire (Bindels et al., 2012; Varian et al., 2016). Aussi, la transplantation fécale de cochons obèses ou minces sur des souris axéniques induit une réplification du métabolisme lipidique ainsi que de la typologie musculaire (Yan et al., 2016) suggérant que le microbiote influence le métabolisme et le phénotype musculaire. Enfin, la supplémentation en probiotiques augmente la masse musculaire, l'endurance et la capacité de récupération en réponse à l'exercice chez le rongeur (Chen et al., 2016; Jäger et al., 2016). Plus récemment, des expériences *in-vitro* ont montré que les AGCC, substrats métaboliques des bactéries, favorisaient le captage de glucose dans des myoblastes humains de manière dose-dépendante (Houghton et al., 2018).

Considérer le microbiote comme un élément régulateur de la fonction musculaire est un concept innovant avec des perspectives scientifiques et socio-économiques évidentes. La

perte de masse et de fonction musculaire est en effet un facteur de risque de morbidité et de mortalité dans un grand nombre de pathologies (Evans, 2010; Levy and Welch, 2015). L'identification du rôle joué par le microbiote intestinal sur les dysfonctions musculaires ouvre de nouvelles voies thérapeutiques innovantes. Dans les domaines de la recherche spatiale et médicale où il devient nécessaire de réduire les conséquences de l'hypoactivité sur le tissu musculaire, la problématique du rôle du microbiote se pose également. Cependant, les mécanismes *in-vivo* mettant en lumière le lien entre microbiote intestinal et muscle squelettique dans des conditions non-pathologiques demeurent peu explorés. Dans ce contexte, étudier l'impact d'une modulation du microbiote intestinal sur le muscle, indépendamment de toute pathologie, représente une première étape permettant de démontrer l'existence fonctionnelle d'un axe microbiote-muscle, et de suggérer certaines voies mécanistiques. Pour cela, le modèle axénique est depuis longtemps utilisé pour étudier l'effet du microbiote intestinal sur les différents organes (Lundberg et al., 2016). Cependant, ces animaux très spécifiques, nés et vivant sans microbiote, peuvent avoir développé à terme, des mécanismes compensatoires (Fröhlich et al., 2016). D'un autre côté, le traitement antibiotique est aujourd'hui reconnu comme une procédure qui induit une déplétion microbienne au niveau intestinal permettant d'en étudier les effets sur l'organisme (Reikvam et al., 2011). De plus, le modèle antibiotique lorsqu'il est stoppé, permet une recolonisation consécutive, rapide et efficace du microbiote intestinal.

L'objectif de cette 3<sup>ème</sup> étude est de déterminer dans le modèle murin l'impact d'une modulation du microbiote intestinal sur le muscle squelettique au niveau structurel, métabolique et fonctionnel. Nous faisons l'hypothèse qu'une déplétion du microbiote intestinal induit des altérations de sa masse, de sa typologie et de sa fonction et que la restauration de ce microbiote normalise les effets.

#### Matériel et Méthodes :

29 Souris C57Bl/6 (âgées de 14 semaines) sont aléatoirement réparties en 3 groupes : un groupe Contrôle (CTL, n=10), un groupe traité avec le traitement antibiotique à large spectre pendant 21 jours (ATB, n=10) et un groupe traité avec le même traitement antibiotique pendant 10 jours suivi de 11 jours de recolonisation naturelle (NAT, n=9). Le protocole lié au traitement antibiotique et à la recolonisation naturelle sont détaillées dans l'Annexe (Fiche méthodologique n°2, page 185). Les fèces des animaux sont récupérés à J0, J7

et J21. Des tests de course sont effectués afin d'étudier l'impact du protocole sur la performance physique (Fiche méthodologique n°3; page 186) : test VMA (J0, J7 et J17) et test de temps limite (J0, J9 et J19). Après les 21 jours de protocole, la glycémie à jeun et le poids des souris sont mesurés avant sacrifice. Le gastrocnémien, le quadriceps, le foie, le tissu adipeux, le caecum et l'iléon sont prélevés, pesés et congelés à -80°C dans l'attente d'analyses. Le muscle EDL est prélevé pour des tests de contractilité *ex-vivo* de force et d'endurance (Fiche méthodologique n°4; page 187)

### Résultats :

Après 10 jours de traitement antibiotique, la communauté des bactéries intestinales des groupes ATB et NAT est complètement déplétée ( $p < 0,001$ ). Elle est cependant restaurée en grande partie dans le groupe NAT après les 10 jours suivants de recolonisation naturelle (aucune différence significative par rapport au groupe CTL à J21). Le temps d'endurance des groupes ATB et NAT après 10 jours d'antibiotiques est significativement réduit par rapport à ceux mesurés à J0 (-27% dans le groupe ATB,  $p = 0,015$  et -12% dans le groupe NAT,  $p = 0,012$ ). A J19, seul le groupe NAT ayant subi la recolonisation naturelle, retrouve une endurance comparable à la valeur de J0, le groupe ATB présentant un temps d'endurance toujours inférieur par rapport à J0 (-19%,  $p = 0,037$ ). La VMA n'a pas été modifiée par le protocole. Si l'on exclut les composantes cardio-pulmonaires et nerveuses inhérentes aux tests de course sur tapis et que nous regardons les résultats obtenus *ex-vivo* sur le muscle EDL à J21, des résultats comparables sont démontrés. La force maximale spécifique *ex-vivo* n'est pas altérée par le traitement antibiotique, en revanche, l'indice de fatigue est significativement inférieur dans le groupe ATB comparé au groupe CTL (-26%,  $p = 0,036$ ) et au groupe NAT (-37%,  $p = 0,001$ ). Cette diminution de l'endurance musculaire n'est pas accompagnée de variation inter-groupe en terme d'atrophie musculaire (i.e. masse musculaire, marqueurs de la balance protéosynthèse/protéolyse, CSA des fibres) ou en lien avec le métabolisme mitochondrial (AMPK, PGC-1 $\alpha$ , COX IV, ADN mitochondrial, *Nrf1*). En revanche, des indices communs de perturbation du métabolisme glucidique apparaissent, avec réduction en condition ATB et restauration en condition NAT, de l'expression au niveau de l'iléon du récepteur entéro-endocrine *Gpr41*, du co-transporteur sodium-glucose *Sglt1* et du stock en glycogène intramusculaire.

### Conclusion :

Ces résultats démontrent que la modulation du microbiote intestinal impacte les qualités d'endurance musculaire. La déplétion bactérienne induite par le traitement antibiotique réduit le temps d'endurance *in-vivo* et *ex-vivo*, la recolonisation naturelle corrige cet effet négatif. Les bactéries intestinales sont donc nécessaires à une fonction musculaire optimisée. Ces résultats apportent de nouvelles données dans la compréhension des mécanismes sous-jacents. En condition non-pathologique, un rôle majeur de la balance protéosynthèse/protéolyse, d'une modification de la typologie musculaire et/ou du métabolisme mitochondrial est ici exclu dans le lien microbiote-muscle. Un impact sur l'homéostasie du glucose qui réduirait la biodisponibilité des substrats énergétiques du muscle, notamment le glycogène est privilégié.

Après avoir démontré cet axe microbiote-muscle, la 2<sup>ème</sup> étape en lien avec cette thèse consiste à étudier l'impact de l'hypoactivité sur la composition du microbiote intestinal, notamment dans un contexte de microgravité simulée chez l'homme afin de répondre à des objectifs de mise au point de contre-mesures innovantes dans le domaine de la recherche spatiale. Avec le soutien financier du CNES, cette 2<sup>ème</sup> étape a été initiée en collaboration avec la clinique spatiale du MEDES de Toulouse mais seulement lors du 2<sup>ème</sup> semestre de la dernière année de doctorat, en raison d'un décalage dans le calendrier de l'expérimentation de 6 mois, indépendant de notre volonté. Le protocole de cette dernière étude et les résultats préliminaires obtenus chez l'animal seront évoqués dans ce manuscrit, dans la partie discussion générale et perspectives.

## RESEARCH ARTICLE | *Role of Gut Microbiota, Gut-Brain and Gut Liver Axes in Physiological Regulation of Inflammation, Energy Balance, and Metabolism*

### Gut bacteria are critical for optimal muscle function: a potential link with glucose homeostasis

Kevin Nay,<sup>1,2\*</sup> Maxence Jollet,<sup>1\*</sup> Benedicte Goustard,<sup>1</sup> Narjes Baati,<sup>1</sup> Barbara Vernus,<sup>1</sup> Maria Pontones,<sup>1</sup> Luz Lefeuvre-Orfila,<sup>2</sup> Claude Bendavid,<sup>3</sup> Olivier Rué,<sup>4</sup> Mahendra Mariadassou,<sup>4</sup> Anne Bonnieu,<sup>1</sup> Vincent Ollendorff,<sup>1</sup> Patricia Lepage,<sup>5</sup>  Frédéric Derbré,<sup>2</sup> and Christelle Koechlin-Ramonatxo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DMEM, University of Montpellier, INRA, Montpellier, France; <sup>2</sup>Laboratory “Movement Sport and Health Sciences” EA7470, University of Rennes/ENS Rennes, France; <sup>3</sup>Institut NuMeCan, Inserm U1241/CHU Rennes/INRA, Université de Rennes, Rennes, France; <sup>4</sup>MaLAGE, INRA, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France; and <sup>5</sup>MICALIS, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

Submitted 3 December 2018; accepted in final form 9 April 2019

**Nay K, Jollet M, Goustard B, Baati N, Vernus B, Pontones M, Lefeuvre-Orfila L, Bendavid C, Rué O, Mariadassou M, Bonnieu A, Ollendorff V, Lepage P, Derbré F, Koechlin-Ramonatxo C.** Gut bacteria are critical for optimal muscle function: a potential link with glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 317: E158–E171, 2019. First published April 30, 2019; doi:10.1152/ajpendo.00521.2018.—Gut microbiota is involved in the development of several chronic diseases, including diabetes, obesity, and cancer, through its interactions with the host organs. It has been suggested that the cross talk between gut microbiota and skeletal muscle plays a role in different pathological conditions, such as intestinal chronic inflammation and cachexia. However, it remains unclear whether gut microbiota directly influences skeletal muscle function. In this work, we studied the impact of gut microbiota modulation on mice skeletal muscle function and investigated the underlying mechanisms. We determined the consequences of gut microbiota depletion after treatment with a mixture of a broad spectrum of antibiotics for 21 days and after 10 days of natural reseeded. We found that, in gut microbiota-depleted mice, running endurance was decreased, as well as the extensor digitorum longus muscle fatigue index in an *ex vivo* contractile test. Importantly, the muscle endurance capacity was efficiently normalized by natural reseeded. These endurance changes were not related to variation in muscle mass, fiber typology, or mitochondrial function. However, several pertinent glucose metabolism markers, such as ileum gene expression of short fatty acid chain and glucose transporters G protein-coupled receptor 41 and sodium-glucose cotransporter 1 and muscle glycogen level, paralleled the muscle endurance changes observed after treatment with antibiotics for 21 days and reseeded. Because glycogen is a key energetic substrate for prolonged exercise, modulating its muscle availability via gut microbiota represents one potent mechanism that can contribute to the gut microbiota-skeletal muscle axis. Taken together, our results strongly support the hypothesis that gut bacteria are required for host optimal skeletal muscle function.

contractile properties; dysbiosis; maximal aerobic velocity; mitochondrial biogenesis; muscle fatigue

#### INTRODUCTION

About 10<sup>14</sup> bacteria live in our gut in symbiosis. This community is now considered as a central organ because of its tremendous impact on human health (17, 37). Indeed, gut microbiota dysbiosis is involved, directly or indirectly, in numerous chronic diseases, such as obesity, type 1 and type 2 diabetes, allergy, and autism (63). The impact of gut microbiota in chronic diseases can be explained by its interactions with the host organs, including brain (21), liver (9), and lung (62).

Recently, the hypothesis of a cross talk between gut microbiota and skeletal muscle has emerged in the literature (5). For example, in mouse models of intestinal chronic inflammation, the restoration of commensal *Escherichia coli* levels efficiently prevents skeletal muscle atrophy (52). Moreover, the recovery of a “healthy” microbiota by synbiotic treatment prolongs survival and reduces cancer proliferation and cachexia development in mouse models of cancer (4, 69). Gut microbiota may also influence the muscle metabolism and fiber phenotype and, consequently, the exercise performance. For instance, after microbiota transplantation from obese or lean pigs, germ-free (GF) mice replicate the fiber characteristics and lipid metabolic profile of the donor’s skeletal muscle (70). Interestingly, probiotic supplementation in mice also improves muscle mass, promotes the slow and oxidative muscle phenotype associated with increased muscle endurance, and reduces exercise-induced muscle damage (14, 35). More recently, *in vitro* experiments showed that microbiota-derived phenolic metabolites found in blood promote muscle glucose uptake in differentiated human skeletal muscle myoblasts in a dose-dependent manner (33).

Considering microbiota as a regulatory element of skeletal muscle function is an innovative idea with significant scientific and socioeconomic consequences. Indeed, loss of muscle function and mass is a risk factor of morbidity and mortality in neuromuscular diseases, and also in many chronic diseases (e.g., cancer cachexia, obesity, diabetes) (24, 40). The identification of the role played by gut microbiota in the skeletal muscle dysfunction related to such chronic diseases could clearly improve the management of these patients. However, the *in vivo* mechanisms underlying the functional link between

\* K. Nay and M. Jollet contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: C. Koechlin-Ramonatxo, DMEM, Univ Montpellier, INRA, Montpellier, France, 2 place Pierre viala, 34060 Montpellier, France (e-mail: christelle.ramonatxo@supagro.inra.fr).

gut microbiota and skeletal muscle in healthy conditions remain poorly explored. In this context, assessing the effect of microbiota modulation on skeletal muscle function would constitute a significant step forward.

Germ-free mice have been previously used to investigate the functional link between microbiota and different organs (42). However, these mice have developed compensatory mechanisms to the life-long absence of microbiota (25). On the other hand, antibiotic treatment is a recognized procedure to induce short-term gut microbiota depletion for studying its impact on the host organs (56). Finally, another advantage of antibiotic treatment is that it allows the subsequent recovery of healthy gut microbiota through natural reseeded.

The aim of this study was to determine in healthy mice whether gut microbiota affects skeletal muscle. To this purpose, we modulated gut microbiota in healthy mice by antibiotic treatment and natural reseeded. We found that antibiotic-mediated gut microbiota depletion induced a decrease of skeletal muscle endurance. Interestingly, this deleterious effect was entirely normalized by natural reseeded. We also investigated putative mechanisms and discovered that glucose homeostasis is modified by gut microbiota, since we observed that short fatty acid chain and glucose transporter [G protein-coupled receptor (Gpr) 41, sodium/glucose cotransporter 1 (Sglt1)] expression in ileum and glycogen content in muscle were decreased after gut microbiota depletion and normalized after natural reseeded. In summary, our study strongly suggests that the presence of bacteria in the gut influences the skeletal muscle metabolism and function of the host.

## MATERIALS AND METHODS

Animal experiments were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee (Autorisation de Projet utilisant des Animaux à des Fins Scientifiques no. 2551–2015110311365663) in accordance with the recommendations of the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Institutes of Health Publication no. 85–23, revised 1996) and according to the European directives (86/609/European Economic Community).

### C57BL/6 Mice

C57BL/6 male mice (14 wk old; Charles River) were randomly divided in the following three experimental groups: control group (CTL,  $n = 10$ ), group treated with antibiotics for 21 days (ATB,  $n = 10$ ), and group treated with antibiotics for 10 days followed by natural reseeded for another 11 days (NAT,  $n = 9$ ). Mice were maintained on a 12:12-h dark-light cycle in a temperature-controlled room in individual cages with filter lids and had ad libitum access to food and water. The diet (3,395 kcal/kg) was standardized and identical for all groups (ref. A03, safe diets). It included 69.2% of cereals, 20.2% of vegetal protein, 6.0% of animal protein, and 4.6% of mineral and vitamin cocktail. The following is a general description of the macronutrient composition: 61.3% protein carbohydrates, 25.2% protein, and 13.5% lipids. This diet is currently used in our animal care facility after the birth of mice. Except for running tests, mice were housed in individual standard cages (not wheel cages) and thus were not subjected to daily exercise.

The ATB group received an oral cocktail of broad-spectrum antibiotics (1 mg/ml ampicillin, 5 mg/ml streptomycin, 1 mg/ml colistin, and 45  $\mu$ g/ml vancomycin in drinking water).

To investigate whether the role of microbiota, not antibiotics per se, has impacts on potential muscle function, we included NAT by allowing ATB to restore microbiota through providing soiled litter from CTL after cessation of antibiotics treatment. More precisely, the

NAT group received the same antibiotic mixture during the first 10 days of the experiment. Next, antibiotic mixture was removed. During the following a 10-day reseeded period, the NAT group received two times soiled litter from CTL group cages. For all groups, bottles were filled with filtered animal care drinking water. All antibiotic bottles were changed every 2 days. Feces were individually collected at days (D) 0, D7, and D21. After 21 days and overnight fasting, mice were weighed and euthanized.

### Euthanasia and Sampling

Mice were euthanized by intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg). The soleus, quadriceps, extensor digitorum longus (EDL), gastrocnemius muscles, white adipose tissue, brown adipose tissue, and cecum were isolated and weighed. Muscles, intestinal sections (duodenum, jejunum, ileum, and colon), and cecum content were collected and immediately frozen in liquid nitrogen.

### In Vivo Running Performance

Running performance was assessed in the three groups (CTL, ATB, and NAT) at the beginning (D0), after 1 wk of antibiotic treatment (D7–D8), and before the end of the experiment (D17–D18). Maximal aerobic velocity (MAV) was determined with a running test in which the speed was gradually increased by 2 m/min from 10 m/min until exhaustion. Exhaustion was defined as the inability to maintain the normal running position and/or after five consecutive seconds in contact with the shock grid ( $<0.2$  mA) at the rear of the treadmill. Endurance capacity was estimated by calculating the endurance limit time ( $T_{lim}$ ) during a submaximal running test, in which the speed started at 12 m/min for the first 2 min and was individually set to 70% of MAV until exhaustion. All tests were repeated at the same time of the day.

### Ex Vivo Muscle Contractile Function

Muscle contractile properties were assessed in ex vivo conditions as previously described (54, 60). This technique allows evaluating the intrinsic muscle contractile properties. After 15 min equilibration in the bath, EDL samples were connected to a force transducer/length servomotor system (model 305B; Cambridge Instruments, Aurora Scientific, Ontario, Canada) and were stimulated along their entire length with platinum wire electrodes. The optimum muscle length (i.e., the muscle length producing maximal twitch tension) was determined. All subsequent measurements were made at optimum muscle length. The isometric tetanic tension was determined (701B Stimulator; Aurora Scientific) using stimulation trains of 500 ms, with pulse duration of 0.5 ms at different frequencies, from 1 to 150 Hz. Stimulus trains were separated by a 1-min interval. The maximum isometric tetanic tension ( $P_0$ ) was determined from the plateau of the frequency-tension curve. After the tension-frequency determination (3 min), the resistance to fatigue was evaluated using a low-frequency fatigue protocol of 50-Hz trains of 700 ms delivered every 2 s for 5 min (43). The muscle fatigue index was defined as the time taken to produce a 50% reduction from the initial maximum power output. After all measurements, EDL samples were removed from the bath, trimmed of the connective tissue, blotted dry, and weighed.

### Composition of Fecal Microbiota

**DNA extraction from feces.** Total cellular DNA was extracted from 0.1 g of animal fecal material using the G'NOME kit (BIO 101, La Jolla, CA) with modifications (26). Fecal samples were homogenized in the supplied cell suspension solution. Cell lysis/denaturing solution was then added, and samples were incubated at 55°C for 2 h. To improve cell lysis, 0.1-mm-diameter silica beads (750  $\mu$ l) were added, and samples were mixed at maximum speed in a Beadbeater (Biospec, Bartlesville, OK) for 10 min. Polyvinylpyrrolidone (15 mg) was

added to ensure removal of polyphenol contamination that could inhibit the quantitative PCR (qPCR) assays. Samples were vortexed and centrifuged at 20,000 g for 3 min, and supernatants were recovered. The remaining pellets were washed with 400  $\mu$ l of 50 mM Tris (pH 8), 20 mM EDTA (pH 8), 100 mM NaCl, and 1% polyvinylpyrrolidone and centrifuged at 20,000 g for 3 min. The washing step was repeated once more, and the resulting supernatants were pooled. Nucleic acids were precipitated by addition of 1 vol of isopropanol, incubation at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 20 min, and centrifugation at 20,000 g for 10 min. Pellets were resuspended in 400  $\mu$ l of distilled water plus 100  $\mu$ l of salt-out mixture and incubated at  $4^{\circ}\text{C}$  for 10 min. Samples were spun at maximum speed for 10 min, and DNA-containing supernatants were transferred to clean 1.5-ml microcentrifuge tubes. DNA was precipitated with two volumes of 100% ethanol at room temperature for 5 min followed by centrifugation at 16,000 g for 5 min. DNA was resuspended in 150  $\mu$ l of Tris-EDTA buffer and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Evaluation of total bacteria by real-time qPCR analysis of bacterial 16S rRNA genes.** The total bacteria present in the fecal samples of each mouse was evaluated by real-time qPCR targeting “all bacteria” 16S rRNA genes using the universal primers F-bact1369 CGGTGAATACGTTCCCGG and R-prok1492 TACGGCTACCTTGT-TACGACTT (26). Analyses were performed using the StepOne Plus detection system (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) with 10  $\mu$ l of Mastermix (PowerUpSybrGreen Master Mix; ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France), 500 nM of both forward and reverse primers, and 5  $\mu$ l of diluted cDNA template and water to a final volume of 15  $\mu$ l. All qPCR assays were performed in duplicate using the following cycling conditions:  $50^{\circ}\text{C}$  for 2 min and then  $95^{\circ}\text{C}$  for 2 min followed by 40 cycles of  $95^{\circ}\text{C}$  for 3 s and  $60^{\circ}\text{C}$  for 30 s, with a final melting step to improve the amplification specificity. For the quantification, the *E. coli* DNA standard curve was generated by plotting the threshold cycles ( $C_t$ ) versus bacterial quantity. When qPCR assays were performed using fecal DNA samples, this standard curve was used to quantify the bacterial population. The lower limit of detection for bacterial enumeration with good precision is  $10^6$  bacteria per gram of stool.

**Evaluation of microbiota composition.** The V3–V4 region of the 16S rRNA genes was amplified using the bacterial primers 343F (5'-CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC TAC GGR AGG CAG CAG-3') and 784R (5'-GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TTA CCA GGG TAT CTA ATC CT-3') modified to add adaptors during the second PCR amplification. PCR assays were performed using the MolTaq 16S DNA polymerase and the corresponding master mix (Molzym, Bremen, Germany). The PCR mix contained 10 ng of DNA, 1  $\mu$ l of dNTPs (10 mM), 1.25  $\mu$ l each of forward and reverse primer (20  $\mu$ M), and 0.5  $\mu$ l of Taq polymerase in a total volume of 50  $\mu$ l. The cycling program was as follows:  $94^{\circ}\text{C}$  for 3 min, followed by 40 cycles at  $94^{\circ}\text{C}$  for 15 s,  $60^{\circ}\text{C}$  for 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  for 60 s, and a final extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 5 min. Sequencing was performed using the MiSeq technology (Illumina) at the Genopole Toulouse Midi-Pyrenees (GeT) genomics facility (<https://get.genotoul.fr/>).

**Metagenomics analysis.** Sequencing data were demultiplexed at the GeT platform. The Galaxy-supported pipeline, called FROGS (Find, Rapidly, Otus with Galaxy Solution), is designed to analyze large sets of amplicon sequences and produce abundance tables of Operational Taxonomic Units (OTUs) and their taxonomic affiliation (23). Briefly, this pipeline includes a preprocessing step where reads are merged with FLASH (45), dereplicated, and filtered according to their length, mismatches in primers with cutadapt (47), and N content. This step is followed by Swarm clustering (46) with an agglomeration distance of  $d = 3$ . Chimera detection is then performed using Vsearch (59) before applying an OTU abundance filter (OTUs  $<0.005\%$  of the total abundance are discarded; see Ref. 8). The most abundant sequences of each OTU were then affiliated with blastn against the Silva v132 database (55). Abundance tables and taxonomy files were manually imported into RStudio (v1.1.419) package Phyloseq 1.23.1 (48).

Estimates of bacterial OTU diversity were estimated using the Shannon and Simpson indexes, in addition to observed richness and Chao indexes.  $\beta$ -Diversity analyses were performed on weighted and unweighted Jaccard and Bray-Curtis distances matrix of DNA samples and were then visualized using principal coordinate analysis and the ggplot2 R package.

**Bacteroidetes and Firmicutes prevalence in ATB group.** We explored the phyla levels in the ATB group despite a very low bacteria DNA concentration in these samples. We quantified two main phyla by real-time qPCR analysis using PCR primers specific for the ribosomal gene of two main bacterial phyla (Bacteroidetes and Firmicutes) gathered from the literature: Firm934F, GGAGYATGTG-GTTTAATTTCGAAGCA, Firm1060R, AGCTGACGACAACCATG-CAC for Firmicutes (29) and mouse intestinal bacteroides forward, GGCGACCGGCGCACGGG, mouse intestinal bacteroides reverse, GRCCTTCCTCTCAGAACCC for Bacteroidetes (49).

### Muscle Fiber Phenotype

The muscle fiber phenotype was determined by assessing the presence of the different myosin heavy chain (MHC) isoforms (slow MHC I and fast MHC IIa, IId/x, IIb isoforms), as previously described (20, 66). To obtain cytosolic protein extracts, gastrocnemius samples were lysed in cold lysis buffer [10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5 M sucrose, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 30 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 1% Nonidet P-40, 0.25% sodium deoxycholate, 50 mM NaF, 100  $\mu$ M sodium orthovanadate, and proteases inhibitor cocktail (5  $\mu$ l/ml, P8340; Sigma)]. Protein concentration was determined using the Lowry assay. Protein samples (6  $\mu$ g) were separated on high-glycerol-containing (30%) gels with an acrylamide-to-bis-acrylamide ratio of 50:1 for the separating gel (8% total acrylamide, pH 8.8) and for the stacking gel (4% total acrylamide, pH 6.8) using a Mini-Protean II dual-slab cell apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA). After electrophoresis (at 140 V in a refrigerated room at  $4^{\circ}\text{C}$  for 22 h), gels were stained with Coomassie blue (IRDye Blue Protein Stain; LI-COR Biosciences, Lincoln, NE), and the different MHC isoforms were identified according to their electrophoretic mobility pattern (20, 66).

### Cross-Sectional Muscle Fiber by Immunohistochemistry

Serial transverse sections (10  $\mu$ m thick) from liquid nitrogen-cooled isopentane frozen quadriceps muscle samples were obtained using a cryostat at  $-25^{\circ}\text{C}$  and mounted on glass microscope slides. Sections were then washed in phosphate-buffered saline (PBS), blocked, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 and 10% horse serum. For fiber cross-sectional area (CSA) determination, sections were stained with an anti-laminin antibody (1:200 in PBS, L9393; Sigma) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1 h, followed by washes in PBS and incubation with the secondary antibody Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1:1,000 in PBS, A11034; Invitrogen) for 1 h. Whole histological sections were imaged with a digital slide scanner Hamamatsu NanoZoomer 2.0-HT and analyzed with the ImageJ software package. On average, 1,800 fibers/animal were quantified according to the method of Demangel et al. (19).

### Transcript and Protein Expression Profiles in Ileum and Skeletal Muscle

To explore potential mechanisms linking gut microbiota composition and skeletal muscle, we measured markers involved in protein turnover, mitochondrial metabolism (36), inflammation, and related to lipid and glucose metabolism in both ileum and/or muscle, as described below (Tables 1 and 2).

**Immunoblotting.** Frozen gastrocnemius muscle samples were homogenized using an Ultra-Turrax homogenizer in an ice-cold extraction buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, and 1% Triton X-100) with 0.5% protease inhibitors, 1% Nonidet P-40, 0.25% sodium deoxycholate, 0.2% NaF, and 100  $\mu$ M

Table 1. List of primary antibodies used for Western Blotting

Marker	Protein	Molecular Weight, kDa	Reference	Source	Dilution
Protein turnover	4EBP1	17	Cell Signaling, 9644	Rabbit	1:1,000
	p-4EBP1 <sup>Thr37/46</sup>	17	Cell Signaling, 2855	Rabbit	1:1,000
	RPS6	32	Cell Signaling, 3944	Rabbit	1:1,000
	p-RPS6 <sup>Ser235/236</sup>	32	Cell Signaling, 4856	Rabbit	1:1,000
	PRAS40	40	Cell Signaling, 2691S	Rabbit	1:1,000
	p-PRAS40 <sup>T246</sup>	40	Cell Signaling, 13175S	Rabbit	1:1,000
	LC3b	14	Cell Signaling, 3868	Rabbit	1:1,000
Energetic Sensor	AMPK $\alpha$	62	Cell Signaling, 5832	Rabbit	1:1,000
	p-AMPK $\alpha$ <sup>THR172</sup>	62	Cell Signaling, 2535	Rabbit	1:1,000
Mitochondrial metabolism	PGC1- $\alpha$	105	Calbiochem, 516557	Rabbit	1:1,000
	COX IV	17	Santa Cruz, sc-69360	Mouse	1:200

AMPK $\alpha$ , AMP-activated protein kinase- $\alpha$ ; PGC1- $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 $\alpha$ ; COX IV, cyclooxygenase IV; 4EBP1, eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1; RPS6, ribosomal protein S6PRAS40, proline-rich Akt substrate of 40 kDa; LC3b, microtubule-associated protein light chain 3b.

sodium orthovanadate added just before extraction. Samples containing 50  $\mu$ g of proteins were resolved on 10–15% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Total proteins were visualized by Ponceau red staining to verify equal loading. Blots were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in TBS-0.2% Tween 20 (TBST) for 1 h, followed by overnight incubation with antibodies against proteins involved in muscle metabolism and proteolysis/synthesis balance (Table 1). After three 5-min washes at room temperature with TBST, membranes were incubated with a secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase at room temperature for 1 h. Blots were washed (three times for 5 min each) with TBST at room temperature, and antibody-bound proteins were revealed using the ECL reagent (Bio-Rad Life Science). Films were scanned and analyzed using the Image Laboratory software. All blots were corrected for loading based on the Ponceau red staining.

**RNA isolation and RT-qPCR.** Total RNA was isolated from gastrocnemius and ileum samples using TRIzol Reagent (200 ml, 15596–018; Invitrogen). RNA concentration was determined by spectrophotometry (Eppendorf, Hamburg, Germany), and purity was checked by calculating the ratio of optical density at 260 to 280 nm (>1.7). RNA quality was verified by 1% agarose gel electrophoresis. Reverse transcription was performed with 1  $\mu$ g of total RNA and the TAKARA kit (TAKRR037A, PrimeScript RT reagent Kit, Perfect Real Time) according to the manufacturer's instructions. qPCR analysis was performed using the StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with 10  $\mu$ l of Powerup SYBR Green Master Mix (A25742; ThermoFisher Scientific), 10 nM of both forward and reverse primers (Table 2), and 5  $\mu$ l of diluted cDNA (final volume of 15  $\mu$ l). All PCR assays were performed in duplicate using the following cycling conditions: 50°C for 2 min and then 95°C

Table 2. Gene expression in skeletal muscle and ileum: sequences of primers (5'–3')

Markers	Gene	Reference	Forward	Reverse
<i>Gene expression in skeletal muscle</i>				
Protein turnover	<i>Igf-1</i>	XM_006513261.2	AGCAGCCTTCCAACCTCAATTAT	GAAGACGACATGATGTGTATCTTTATC
	<i>FoxO3a</i>	XM_006512806.1	GGAAATGGGCAAAGCAGA	AAACGGATCACTGTCCACTTG
	<i>Murf1 (Trim63)</i>	NM_001039048.2	TCTGTCAGAGTGACCAAGG	GGCGTAGAGGGTGTCAAAC
Inflammation	<i>Trif (Ticam1)</i>	NM_174989.4	CAGCTCAAGACCCTACAGC	TCCACACAGCCCTGCTC
	<i>Nf-<math>\kappa</math>B</i>	NM_008689.2	TGAGGACGGGTATGCAC	TCACATGAAGTATTTCCAGGTTT
Lipid transport	<i>CD36</i>	NM_001159557.1	CAGATCCGAACACAGCGTAG	GCGACATGATTAATGGCACA
Mitochondrial metabolism	<i>Cpt1</i>	NM_009948.2	CATCCCAGGCAAAGAGACA	AAGCGACCTTTGTGGTAGACA
	<i>Nrf-1</i>	NM_001164226	GGTGGGGACAGATAGTAGTCT	ATGCTCACAGGGATCTGGAC
Mitochondrial content	<i>ATP5b</i>	NC_000076	GTTTGCTGAAGCCACACTCA	CATGATTCTGCCCAAGGTCT
	<i>ND2</i>	NC_005089.1	AAGGGATCCCACTGCACATA	AGTCTCCTCATGCCCTAT
	<i>ND5</i>	NC_005089.1	ATAACCGCATCGGAGACATC	GAGGCCAAATTGTGCTGATT
<i>Gene expression in ileum</i>				
Glucose and lipid metabolism	<i>Fiaf (Angptl4)</i>	NM_020581.2	GGGACCTTAACCTGTGCCAAG	GAATGGCTACAGGTACCAAACC
Inflammation	<i>Myd88</i>	NM_010851.2	GCCTTGTAGACCGTGAGGAT	CTAAGTATTTCTGGCAGTCTCCT
	<i>Tlr4</i>	NM_021297.3	GGACTCTGATCATGGCACTG	CTGATCCATGCATTGGTAGGT
Branched amino acids receptor	<i>Lat-1</i>	NM_011404.3	ATGTGGCTCCGATTCAAGA	GGAGGGCCAGATTACCT
Short-chain fatty acid receptor	<i>Gpr40 (Ffar1)</i>	NM_194057.2	AGCGCTCTCCTCACACTC	CTAGCCACATTTGGAGGCATTA
Mean-chain fatty acid receptor	<i>Gpr41 (Ffar3)</i>	NM_001168509.1	TGCTCTGAAGAAGCCAAATCA	TTCTCCTGTGGTCCAGTGCT
Long-chain fatty acid receptor	<i>Gpr120 (Ffar4)</i>	NM_181748.2	TTGGTGTGAGCGTCTG	CCAGCAGTGAGACGACAAAG
Glucose transporter	<i>Sglt1</i>	NC_000071.6	CTGGCAGGCCGAAGTATG	TTCCAATGTACTGGCAAAGAG
Reference gene	<i>Arp (Rplp0)</i>	NM_007475.5	ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG	TCCCACCTTGTCTCCAGTCT
	$\alpha$ -Tubulin	NM_011653.2	CTGGAACCCACGGTCTATC	GTGGCCACGACATAGTTATT

Igf, 1, insulin-like growth factor-I; Foxo3a, forkhead box O3; Murf1, muscle RING-finger protein-1; Trif, TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ; CD36, cluster of differentiation 36; Cpt1, carnitine palmitoyltransferase 1; Nrf1, nuclear respiratory factor 1; ATP5b, ATP synthase F1 subunit  $\beta$ ; ND2, mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 2; ND5, mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 5; Fiaf, fasting-induced adipose factor; Myd88, myeloid differentiation primary response 88; Tlr4, Toll-like receptor 4; Lat-1, large neutral amino acid transporter 1; Gpr40, G protein-coupled receptor 40; Gpr41, G protein-coupled receptor 41; Gpr120, G protein-coupled receptor 120; sodium/glucose cotransporter 1; Sglt1, sodium-glucose cotransporter 1; Arp, acidic ribosomal phosphoprotein.

for 2 min followed by 40 cycles of 95°C for 3 s and 60°C for 30 s. The relative mRNA levels were normalized to  $\alpha$ -tubulin ( $\alpha$ -tub) and acidic ribosomal phosphoprotein P<sub>0</sub>, as housekeeping genes unaffected by the experimental conditions. Results were expressed using the C<sub>t</sub> method to generate  $\Delta\Delta C_t$  values with template dilutions ranging from 10<sup>1</sup> to 10<sup>6</sup> copies. The PCR overall efficiency (E) was calculated from the slopes of the standard curves according to the equation  $E = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1$ , and this value was higher than 95% for all assays. The relative abundance of each sample was then normalized according to the equation: relative quantity =  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . All of the experiments were performed according to the minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiment (MIQE) guidelines (11, 61).

**Mitochondrial DNA isolation and measurement by RT-qPCR.** Total DNA was extracted from the gastrocnemius muscle using a QIAamp DNA kit (Qiagen). Genomic (ATP synthase- $\beta$ ) and mitochondrial DNA (means of NADH dehydrogenase subunit 5 and NADH dehydrogenase subunit 2) were quantified by quantitative real-time polymerase chain reaction (10). Each sample was run in duplicate. Results were expressed using the C<sub>t</sub> with genomic DNA as the control. The relative changes in the expression level of mitochondrial DNA were calculated by the  $\Delta\Delta C_t$  formula.

#### Muscle Glycogen Content

The acid-hydrolysis method used for glycogen quantification was adapted from the protocols described by Adamo and Graham (1) and Jansson (38). Frozen gastrocnemius muscle powder (20–30 mg) was placed in ice-cooled 6% perchloric acid and 1 M hydrochloric acid. Samples were then boiled at 100°C for 2 h, cooled on ice for 10 min, and centrifuged (1,300 revolutions/min for 5 min). Supernatant (12  $\mu$ l) was removed from each sample, diluted in 200  $\mu$ l of GOD-PAP solution (Biolabo, Maizy, France), and incubated in the dark at 37°C for 20 min to determine the glucose concentration. Absorbance was measured at 500 nm using a microplate reader. Glycosyl units produced by glycogen hydrolysis were expressed as micromole per milligram of wet muscle weight.

#### Muscle Triglyceride Content

Muscle triglycerides were determined by using the DiaSys kit (Diagnostic System, Grabels, France) following a preliminary organic phase extraction according to Bligh & Dyer's method. Briefly, 50  $\mu$ g of gastrocnemius samples were crushed with 500  $\mu$ l of 150 mM sodium chloride. Next, 150  $\mu$ l of muscle homogenates were extracted with 600  $\mu$ l of a methanol-chloroform mixture (1:1, vol/vol). The organic layers were collected after centrifugation (10,000 g for 10 min) and dried under nitrogen. Dry samples were reconstituted in 37.5  $\mu$ l of isopropanol-acetonitrile-water mixture (2:1:1, vol/vol/vol), and 10  $\mu$ l were analyzed according to the manufacturer's recommendations (7).

#### Statistical Analysis

All data are presented as means  $\pm$  SE. The normality of each distribution and homogeneity of variance were assessed with the Kolmogorov-Smirnov and Fischer test, respectively. Significance between CTL, ATB, and NAT data was checked using a one-way analysis of variance. Significant interaction effects were analyzed with the Fischer least-significant difference post hoc test. For some parameters, the unpaired *t*-test was used to compare directly CTL versus NAT or CTL versus ATB. The Mann-Whitney rank-sum test was chosen when the normality and/or equal-variance tests failed. For running tests, significance between parameters at D0, D7, and D17 was checked using the paired *t*-test, after checking normality. For all statistical analyses, the significance level was set at 0.05. Data were analyzed using the statistical package GraphPad Prism version 6.02 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Table 3. Effects of antibiotic treatment and natural reseeded on body mass, glycemia, cecum liver and adipose tissue weights, as well food intake and hydration

	CTL	ATB	NAT
Body wt, g	25.5 $\pm$ 0.8	25.4 $\pm$ 0.4	25.0 $\pm$ 0.7
Glycemia, mg/dl	101.0 $\pm$ 3.8	101.7 $\pm$ 5.1	93.4 $\pm$ 4.4
Cecum wt, mg	324.7 $\pm$ 35.0	1,804.0 $\pm$ 154.0***	394.9 $\pm$ 25.2†††
Liver wt, mg/g	44.3 $\pm$ 1.4	38.3 $\pm$ 0.7**	42.3 $\pm$ 1.2††
Adipose tissue wt, mg/g			
White adipose tissue	27.8 $\pm$ 4.4	19.8 $\pm$ 3.2	26.4 $\pm$ 2.1
Brown adipose tissue	3.0 $\pm$ 0.2	2.7 $\pm$ 1.7	3.4 $\pm$ 0.2
Food intake, g/wk	29.9 $\pm$ 1.2	28.4 $\pm$ 1.1	29.0 $\pm$ 0.7
Hydration, ml/wk	34.6 $\pm$ 1.9	36.1 $\pm$ 1.6	36.0 $\pm$ 1.1

Values are group means at day 21 for weights and weekly for food intake and hydration  $\pm$  SE; *n* = 9–10 for each group. CTL, control; ATB, group treated with antibiotics for 21 days; NAT, treated with antibiotics for 10 days followed by natural reseeded for another 11 days; *Rplp0*, ribosomal phosphoprotein P<sub>0</sub>. Significance was checked using ANOVA followed by least-significant difference Fisher post hoc test. \*\**P*  $\leq$  0.01 and \*\*\**P* < 0.001 versus the CTL group. ††*P* < 0.01 and †††*P* < 0.001 versus the ATB group.

## RESULTS

### Treatment Tolerance

During the entire study period, neither diarrhea nor visible adverse side effects were recorded. Consequently, no mouse was excluded from the data analysis. Food intake and hydration were checked daily, and no significant change was observed during the entire study period (Table 3).

### Antibiotic Treatment and Natural Reseeding Efficiently Modulate Gut Microbiota

To confirm gut microbiota depletion induced by the antibiotic treatment, we quantified by Q-PCR all bacteria in feces, as well as cecum weight (cecum hypertrophy is a marker of gut microbiota depletion; see Ref. 56). At D0, microbiota DNA content did not differ in the three mouse groups (CTL, ATB, and NAT) (Fig. 1A). After 7 days of antibiotic treatment (D7), bacterial DNA content was strongly reduced in the ATB and NAT groups (Fig. 1B). This effect was still present in the ATB group after 21 days of treatment (D21) (Fig. 1C). Despite a very low bacteria DNA concentration in gut samples in the ATB group at D21, we managed to estimate the phyla prevalence by qPCR analysis and found the following: 83% of Firmicutes and 17% of Bacteroidetes; the other phyla were not detectable (data not shown).

Conversely, natural reseeded restored the bacterial DNA level in the NAT group (Fig. 1C). At D21,  $\alpha$ -diversity (Fig. 1D) and  $\beta$ -diversity analyses (Fig. 1, E and F) showed no statistical differences in microbiota between CTL and NAT groups. Neither phyla abundance (Fig. 1, G and H) nor levels of the main family from Bacteroides and Firmicutes showed statistical differences between CTL and NAT groups (Fig. 1, I and J). Moreover, cecum weight at D21 was significantly higher in ATB mice than in the CTL group (+456%, *P* < 0.001; Table 3). Cecum weight in the NAT group was significantly lower than in the ATB group (−76%, *P* = 0.003) and did not significantly differ from that

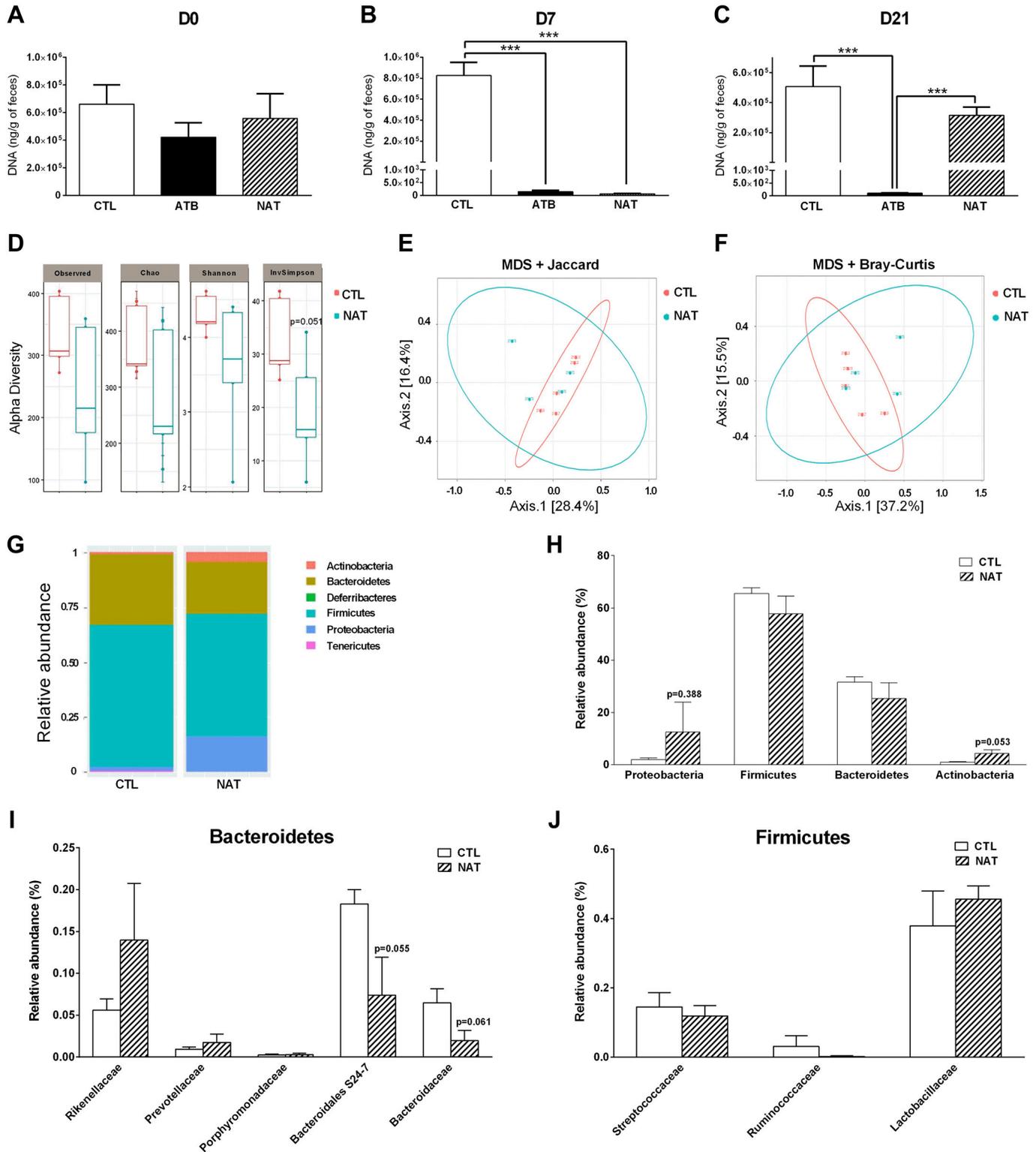


Fig. 1. Effect of gut microbiota depletion and natural reseeding on bacterial DNA content,  $\alpha$ - and  $\beta$ -diversity indexes, and phyla and families abundance. Real-time quantitative PCR (qPCR) quantification of all bacteria in feces at day (D) 0 (A) and D7 (B) and in the cecum at D21 (C) ( $n = 5$ ). Bacterial  $\alpha$ -diversity (D) and  $\beta$ -diversity (E and F) in cecum at D21 ( $n = 5$ ). Sample denotation: red, control (CTL); blue, treatment with antibiotics for 10 days followed by natural reseeding for another 11 days (NAT). Bacterial phyla (G and H) and families (I and J) abundance in cecum at D21 ( $n = 5$ ). For bacterial DNA content, a 1-way ANOVA followed by the least-significant difference (LSD) Fisher post hoc test was used. To evaluate the reseeding process, bacterial and families abundance, as well as  $\alpha$ -diversity, was compared in CTL and NAT groups using unpaired nonparametric  $t$ -test. For  $\beta$ -diversity, significance between CTL and the group treated with antibiotics for 21 days (ATB) was checked using PERMANOVA, as implemented in the "Adonis" function from the R vegan package, with 9,999 permutations. \*\*\* $P \leq 0.001$  vs. CTL, ATB, and NAT.

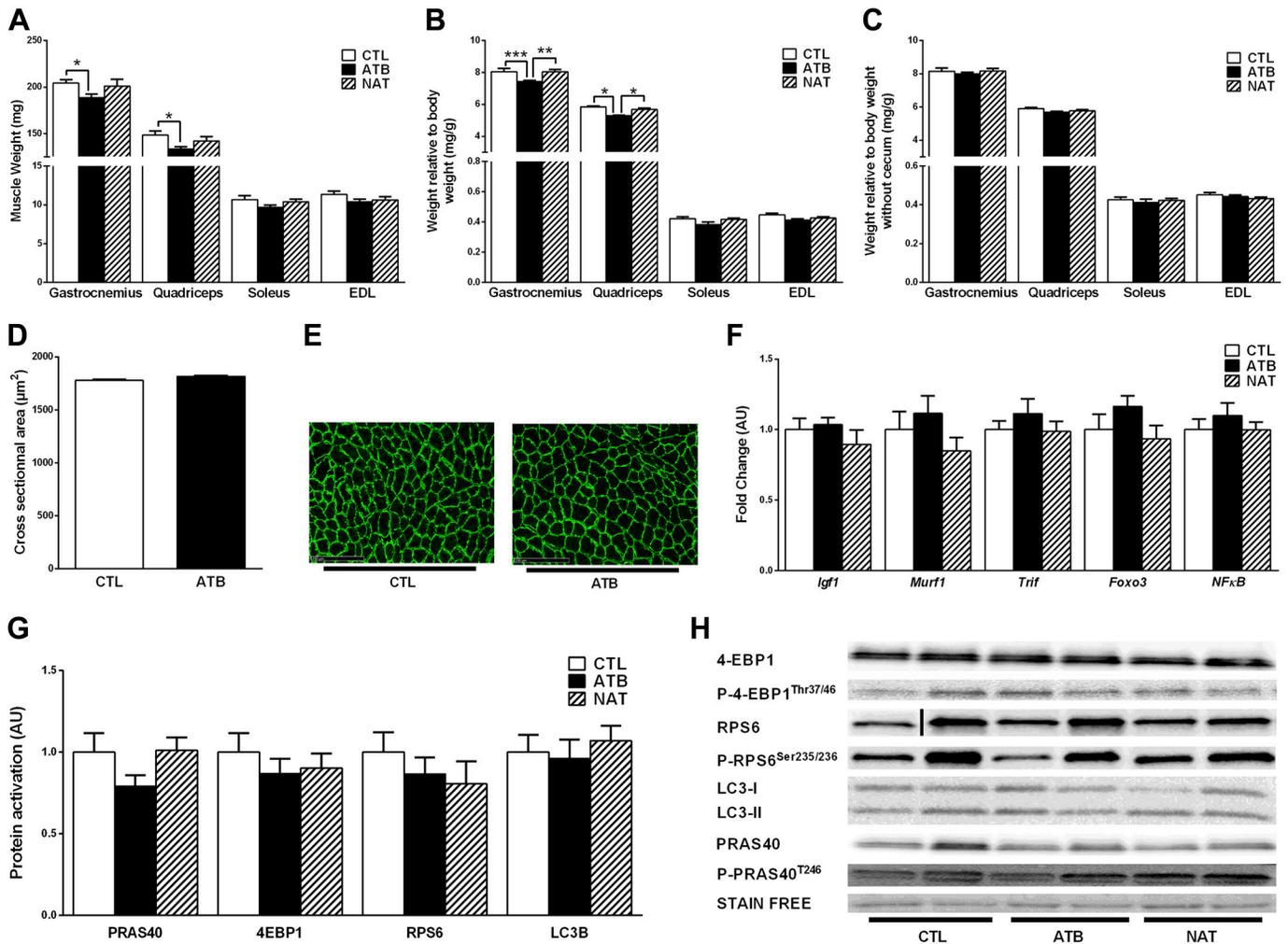


Fig. 2. Effects of gut microbiota depletion and natural reseeding on skeletal muscle structure. Wet weight (A) and weight relative to body weight (B) at day (D) 21 in the control (CTL) group, the group treated with antibiotics for 21 days (ATB), and/or mice treated with antibiotics for 10 days followed by natural reseeding for another 11 days (NAT) in the gastrocnemius, quadriceps, soleus, and extensor digitorum longus (EDL). C: weight relative to body weight after subtraction of cecum weight at D21. D: quadriceps fiber cross-sectional area (CSA) distribution at D21. E: representative images of quadriceps muscle sections at D21. F: RT-quantitative PCR (qPCR) analysis of *Igf-1*, *Murf-1*, *Trif*, *Foxo-3a*, and *Nf-κB* expression in gastrocnemius muscle at D21. G: activation of PRAS40, 4EBP1, RPS6, and LC3B in gastrocnemius muscle at D21. H: representative blotting images used for the quantification shown in G. On the blot for RPS6 (G), a line was added to show an arrangement because of an empty well between the samples on the Western blot gel. Values are means  $\pm$  SE. Significance between CTL, ATB, and NAT was checked using a 1-way ANOVA followed by the least-significant difference (LSD) Fisher post hoc. The mean muscle fiber CSA was compared in CTL and NAT groups using unpaired *t*-test (D). \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , and \*\*\* $P \leq 0.001$  ( $n = 8-10$  for each group).

of the CTL group (Table 3). All together, these results support that the NAT group can be used to assess the effects of gut microbiota per se on skeletal muscle function together with the ATB group.

#### Effects of Gut Microbiota Depletion on the Structure of Skeletal Muscle Mass

At the end of the study, the muscle wet weight (Fig. 2A) and mass index calculated as wet weight normalized to the whole body weight (Fig. 2B) were significantly lower for gastrocnemius and quadriceps, but not for EDL and soleus, in the ATB group compared with the CTL and NAT groups (on average, between 7 and 10% of reduction). Normalization to the whole body weight could be misleading because of the cecum hypertrophy in the ATB group (Table 3). Indeed, when the muscle mass index was normalized to

body weight without the cecum weight, the weight of gastrocnemius, quadriceps, EDL, and soleus was comparable between CTL and ATB mice (Fig. 2C). Moreover, histological analysis on quadriceps muscle samples showed that the fiber CSA was comparable between CTL and ATB groups (Fig. 2, D and E). Similarly, gene/protein activation of several key factors involved in protein synthesis, proteolysis, inflammation, and autophagy (*Igf1*, *Murf1*, *Trif*, *Foxo-3a*, and *NfκB*, PRAS40, 4EBP1, RPS6, and LC3B) was comparable in the gastrocnemius muscle of CTL and ATB mice (Fig. 2, F–H).

#### Gut Microbiota Depletion Induces Muscle Fatigability That Is Reversed by Natural Reseeding

To determine the impact of gut microbiota depletion/natural reseeding on skeletal muscle function, mice under-

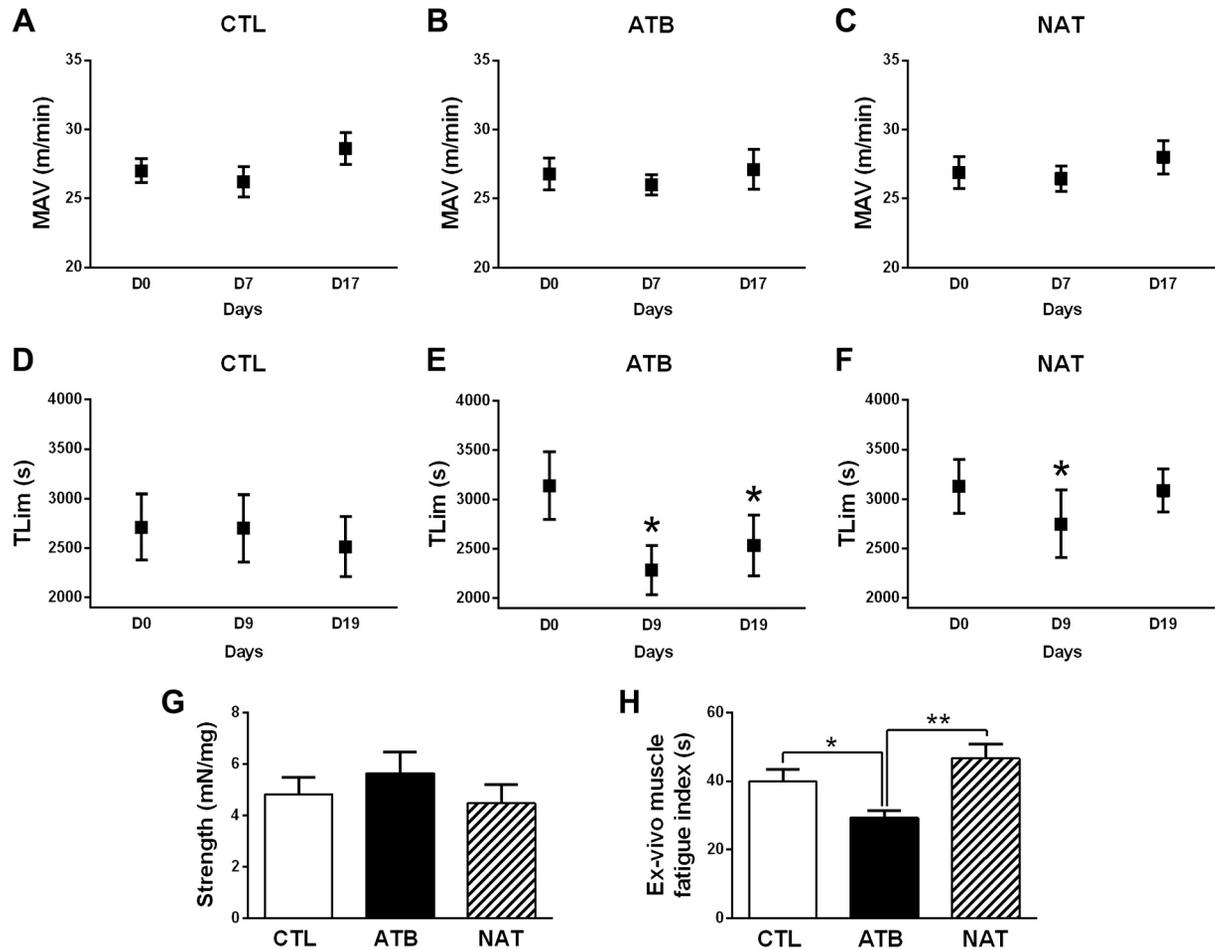


Fig. 3. Effects of gut microbiota depletion and natural reseeding on skeletal muscle function. Maximal aerobic velocity (MAV) in the control group (CTL, A), the group treated with antibiotics for 21 days (ATB, B), and the group treated with antibiotics for 10 days followed by natural reseeding for another 11 days (NAT, C) at day (D) 0, D7, and D17. Limit time to exhaustion during a submaximal running test in the CTL (D), ATB (E), and NAT (F) groups at D0, D9, and D19. G: ex vivo extensor digitorum longus (EDL) maximal strength relative to its weight at D21. H: ex vivo EDL muscle fatigue index at D21. Values are means  $\pm$  SE. Significance was checked using the paired *t*-test (A–F) and a 1-way ANOVA followed by the least-significant difference (LSD) Fischer post hoc test (G and H). \* $P \leq 0.05$  vs. D0 (E and F) and ATB vs. CTL (H). \*\* $P \leq 0.01$ , ATB vs. NAT (H) ( $n = 9$ –10 for each group).

went running tests at different time points. Moreover, at the end of the study, we tested ex vivo the contractile properties of EDL muscle samples to identify the specific role of skeletal muscle on the running performance (Fig. 3). MAV, which is dependent on the maximal oxygen consumption, was comparable in the three groups (CTL, ATB, and NAT) and at all time points (D0, D7, and D17) (Fig. 3, A–C). Conversely, performance indicators related to endurance were significantly affected by gut microbiota changes (Fig. 3, D–F). Specifically,  $T_{lim}$  during the running endurance test was significantly lower at D9 compared with the D0 values in ATB and NAT mice ( $-27\%$  in the ATB group,  $P = 0.015$ , and  $-12\%$  in the NAT group,  $P = 0.012$ ; Fig. 3E). At D19,  $T_{lim}$  was still lower than at D0 in the ATB group ( $-19.3\%$ ,  $P = 0.037$ ), whereas it was back to the D0 values in the NAT group (Fig. 3F). Ex vivo contractile tests performed at the end of the protocol showed that EDL maximal strength was not affected by the experimental conditions (Fig. 3G), whereas EDL muscle fatigue index was significantly reduced in the ATB group compared with both CTL and NAT groups ( $-26\%$ ,  $P = 0.036$ , and  $-37\%$ ,  $P = 0.001$ , respectively; Fig. 3H). EDL muscle

fatigue index in the CTL and NAT groups did not differ significantly.

#### Potential Mechanisms Linking Gut Microbiota and Skeletal Muscle Function: Focus on Glucose Homeostasis

Several cellular adaptations, including muscle fiber phenotype, mitochondrial biogenesis, and/or substrate availability, affect skeletal muscle endurance (22). Here, we observed that the expression of the different MHC isoforms in gastrocnemius muscle was comparable in CTL and ATB (Fig. 4, A and B). Similarly, the protein level of key markers of mitochondrial metabolism [AMP-activated protein kinase (AMPK), peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 $\alpha$ , and cyclooxygenase IV; Fig. 4, C and D] or the mRNA expression of Glut4, cluster of differentiation 36 (*Cd36*), carnitine palmitoyl-transferase 1 (*Cpt1*), as well nuclear respiratory factor-1 and the mitochondrial DNA content (Fig. 4, E and F) did not change after ATB treatment. These results suggest that disruption of gut microbiota composition does not impact the myofiber phenotype or the mitochondrial metabolism.

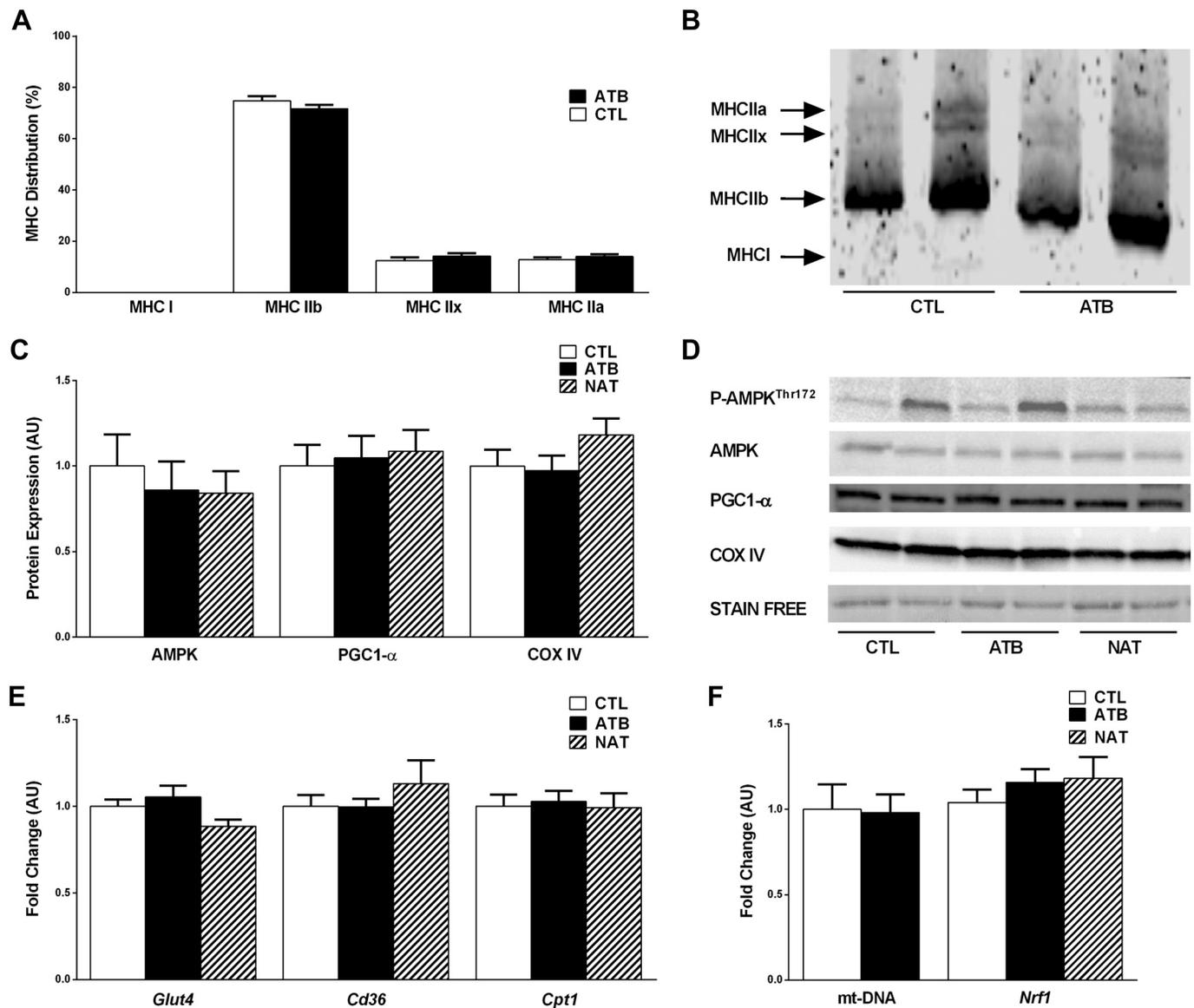


Fig. 4. Effects of gut microbiota depletion and natural reseeding on skeletal muscle metabolism. *A*: gastrocnemius myosin heavy chain (MHC) distribution at day (D) 21. *B*: representative images of protein electrophoresis shown in *A*. *C*: cluster of differentiation 36 (*Cd36*) and carnitine palmitoyltransferase 1 (*Cpt1*) mRNA expression in gastrocnemius samples at D21. *D*: mitochondrial DNA content and nuclear respiratory factor 1 (*Nrf-1*) mRNA expression in gastrocnemius samples at D21. *E*: AMP-activated protein kinase (AMPK) phosphorylation, peroxisome proliferator-activated receptor coactivator (PGC)-1 $\alpha$ , and cyclooxygenase (COX) IV protein content in gastrocnemius muscles at D21. *F*: representative blotting images used for the quantification shown in *E*. Values are means  $\pm$  SE. Significance between groups was checked using a 1-way ANOVA followed by the least-significant difference (LSD) Fisher post hoc test, except for mitochondrial DNA, where Mann-Whitney was used to compare CTL and the group treated with antibiotics for 21 days (ATB) ( $n = 8-10$  for each group).

Gut microbiota depletion leads to major changes in intestinal epithelial cells (71), and the gut microbiome has a profound influence on inflammatory states (65). Here, we reported in ileum that ATB treatment and subsequent natural reseeding did not affect gene expression of myeloid differentiation primary response 88 and Toll-like receptor 4 (*Tlr4*), two canonical proteins involved in inflammatory signaling pathways (Fig. 5A).

As shown by others, the lack of some bacteria-derived metabolites could interfere with the metabolism of energetic substrate, such as lipid and glucose metabolism (12, 33), and this could play important roles in the gut-skeletal muscle axis. In this context, fasting-induced adipocyte factor (*Fiaf*), also known as angiopoietin like protein 4, is a key protein

reducing fatty acids synthesis, adipogenesis, and lipogenesis (13). *Fiaf* expression is known to be negatively regulated by intestinal bacteria (2). In our study, *Fiaf* gene expression in ileum was indeed significantly higher in the ATB group compared with CTL and NAT groups (+164%,  $P = 0.001$ , and +135%,  $P = 0.002$ , respectively; Fig. 5A). However, this *Fiaf* increase was not associated with changes in muscle triglyceride levels in all experimental conditions (Fig. 5C). Finally, gut microbiota modulation did not affect *Lat1* expression, suggesting no major effects on branched amino acid transport (Fig. 5A).

Antibiotic treatment and reseeding did not exert any effect on free fatty acid receptor 1 and 4 (*Gpr40* and *Gpr120*, respectively), both receptors being activated by medium- to

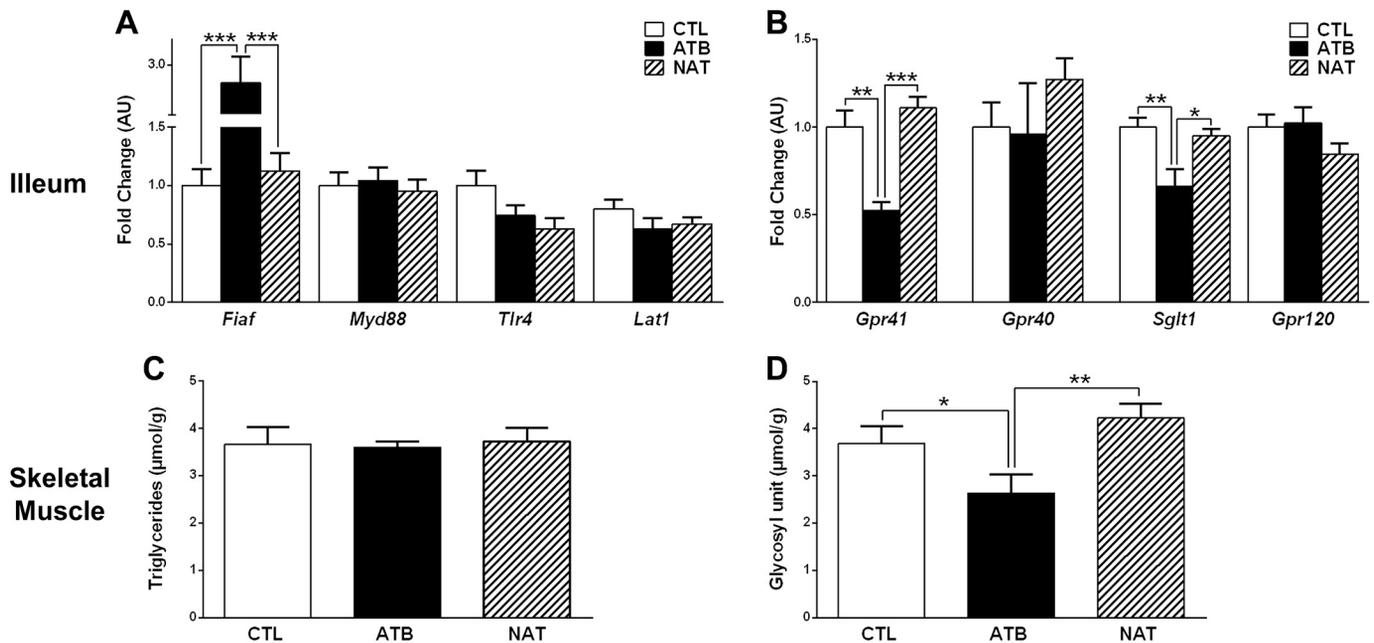


Fig. 5. Effects of gut microbiota depletion and natural reseeding on energetic substrate metabolism. **A:** RT-quantitative PCR (qPCR) expression of *Fiaf*, myeloid differentiation primary response 88 (*Myd88*), Toll-like receptor 4 (*Tlr4*), and *Lat1* in the ileum at day (D) 21 ( $n = 8$ ). **B:** RT-qPCR expression of *G* protein-coupled receptor (*Gpr*) 41, *Gpr40*, *Gpr120*, and sodium/glucose cotransporter 1 (*Sglt1*) in the ileum at D21 ( $n = 8$ ). **C:** gastrocnemius triglyceride content at D21 ( $n = 9-10$ ). **D:** gastrocnemius glycogen content at D21 ( $n = 9-10$ ). Values are means  $\pm$  SE. Significance between the 3 groups was checked using a 1-way ANOVA followed by the least-significant difference (LSD) Fisher post hoc test.  $*P \leq 0.05$ , group treated with antibiotics for 21 days (ATB) vs. CTL and group treated with antibiotics for 10 days followed by natural reseeding for another 11 days (NAT).  $**P \leq 0.01$ , ATB vs. CTL and NAT;  $***P \leq 0.001$ , ATB vs. CTL and NAT.

long-chain fatty acids. However, short-chain fatty acids (SCFAs) are the most abundant microbial metabolites derived from intestine, and SCFAs activated enteroendocrine cells via the free fatty acid receptor 3 (*Gpr41*). Interestingly, we reported in ileum samples that *Gpr41* gene expression was significantly decreased in the ATB group compared with the CTL group ( $-48\%$ ,  $P = 0.007$ ; Fig. 5B). After natural reseeding, the NAT group exhibited higher *Gpr41* mRNA levels compared with the ATB group ( $+111\%$ ,  $P < 0.001$ ; Fig. 5B). Because the activity of these enteroendocrine receptors is linked to glucose metabolism (30, 44, 68), we measured additional markers both in ileum and skeletal muscle. It is noteworthy that the gene expression of *Sglt1* followed the same pattern in ileum as *Gpr41*, i.e., significant lower levels in the ATB condition ( $-34\%$ ;  $P = 0.001$  versus the CTL group; Fig. 5B), with such effect being reversed by natural reseeding ( $+44\%$ ,  $P = 0.033$  versus the ATB group; Fig. 5B). However, these gene expression changes were not associated with modification in blood glucose levels (Table 3). Finally, because glucose stored in glycogen is the one main substrate involved in muscle energy supply during endurance exercise (22), we monitored muscle glycogen content. In agreement with results obtained in ileum on *Gpr41* and *Sglt1*, muscle glycogen content was significantly lower in ATB than in CTL mice (Fig. 5D), and this was normalized after natural reseeding (Fig. 5D).

## DISCUSSION

The present study is the first one designed to explore the consequences of gut microbiota depletion and reseeding on skeletal muscle structure and metabolism. Using an experimental model of gut microbiota modulation, we demon-

strated negative impacts on skeletal muscle endurance, reversed by bacterial reseeding. Our ex vivo functional analyses clearly support a role of gut microbiota on muscle intrinsic contractile properties. Gut microbiota appears to play a role in glucose homeostasis, since we observed that short fatty acid chain and glucose transporters (*Gpr41*, *Sglt1*) in ileum and muscle glycogen content paralleled the muscle endurance changes observed after ATB treatment and reseeding. Altogether, our results highlight that gut microbiota depletion impact on muscle endurance can be mediated through the modulation of muscle glycogen availability.

### Gut Microbiota and Muscle Mass

Research from Bindels et al. suggested a link between gut microbiota profile and skeletal muscle mass in pathological conditions (4, 6). Recently, Varian et al. (69) showed that probiotic supplementation partially prevents skeletal muscle atrophy related to cancer cachexia and sarcopenia. Here, in healthy mice, we found lower wet weight and mass index of some muscles in ATB mice. However, the cecum hypertrophy, a widely known phenomenon associated with depleted bacteria condition (41), could mask a body weight reduction in these mice, as indicated by the absence of difference on muscle mass when normalization was done after subtraction of the cecum weight. This suggests that gut microbiota modulation does not directly cause skeletal muscle atrophy in our experimental conditions. This is emphasized by the absence of changes in muscle strength or changes in protein expression of factors involved in muscle protein turnover, in quadriceps fiber CSA, and in the ex vivo maximal strength. In view of these data, we

suggest that gut microbiota only slightly influences skeletal muscle mass in healthy conditions.

### *Gut Microbiota and Muscle Endurance*

It has been recently proposed that gut microbiota could affect physical performance (15). For instance, the diversity of gut microorganisms is higher in professional athletes (16). In addition, endurance performance is more enhanced in conventionalized and specific pathogen-free (SPF) mice than in GF mice (34). Several skeletal muscle-independent factors can alter the endurance performance, including cardiovascular deficiency, insufficient muscle capillarity, central fatigue, or pain (27, 31, 50, 53). To determine the specific impact of gut microbiota modulation on skeletal muscle, we performed, in addition to in vivo running tests, ex vivo muscle contractility tests. We observed in both experimental conditions a negative effect of gut microbiota depletion on muscle endurance, fully reversed by natural reseeded. Altogether, the ex vivo results confirm that gut microbiota specifically and directly affect muscle endurance.

Skeletal muscle endurance can be affected by several muscle alterations, including changes in muscle contractile phenotype, mitochondrial biogenesis, and/or reduction in substrate availability (22). Interestingly, after transplantation of gut microbiota from obese or lean pigs to GF mice, these mice replicated the skeletal muscle fiber characteristics and lipid metabolic profiles of the donor (70). Here, the absence of significant modifications in the proportion of the different MHC isoforms in the ATB group excludes major effects of microbiota changes on the muscle contractile phenotype. Bäckhed et al. (3) observed that, in GF mice, AMPK activity is increased in liver and skeletal muscle and suggested that this adaptation is a key mechanism by which GF mice are better protected from obesity. In our study, however, we did not find any modification in skeletal muscles in the activity of AMPK, the expression of peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 $\alpha$ , and mitochondrial DNA content in skeletal muscle of ATB mice. This suggests that mitochondrial biogenesis remained unchanged in ATB mice and therefore that endurance alteration is probably not the result of reduction of the maximal muscle oxygen consumption capacity. Such muscle metabolic discrepancies between ATB mice and GF mice could be because of differences in the duration of skeletal muscle exposure to a systemic environment with depleted gut microbiota.

### *Gut Microbiota Modulation Targets Muscle Glycogen Availability*

Muscle endurance also depends on metabolic parameters, including substrate availability in skeletal muscle, such as glycogen and triglycerides, two key energetic substrates that regulate muscle capacity during prolonged strenuous exercise (28, 32). Interestingly, GF mice exhibit higher gut Fiaf expression compared with conventionalized mice, leading among others to a reduction of triglyceride storage in peripheral tissues, including liver (2). Fiaf is a glycoprotein recognized to also promote fatty acid oxidation through AMPK activation in skeletal muscle and to attenuate muscle lipid uptake by inhibiting lipoprotein lipase activity (13, 57). Here, we confirmed the data of Bäckhed and colleagues by showing that gut Fiaf gene expression is modulated by the lack/presence of gut

bacteria. However, these results were not associated in skeletal muscle with changes in 1) free fatty acid transporter gene expression (*Cd36*, *Cpt1*), 2) AMPK activation, and 3) muscle triglyceride content. Altogether, these findings suggest that muscle lipid metabolism is unlikely to play a major role in alterations of muscle endurance observed after gut microbiota modulation.

Our data on glucose homeostasis both in ileum and skeletal muscle open some interesting hypotheses. Indeed, in ileum, *Gpr41* and *Sglt1* gene expression patterns followed the skeletal muscle endurance capacity (i.e., decrease in bacteria-depleted conditions reversible upon natural reseeded). Dependent to metabolites derived from gut bacteria, *Gpr41* contributes to enteroendocrine cell activation and, by its action on glucagon-like peptide 1 release, regulates glucose-mediated insulin secretion (30, 68). In the same line, we observed the modulation of expression of *Sglt1* gene, encoding a sodium-glucose cotransporter located in enterocytes, which could reflect glucose homeostasis dysregulation in the intestinal tract. Overall, these results are in agreement with previous studies using antibiotic-induced microbiome depletion and showing a modulation of gene expression programs required for glucose homeostasis both in intestine and liver (18, 58, 72). Zarrinpar and colleagues also highlighted that antibiotics, by depleting gut bacteria in colon, reduce SCFA production and deprive colonocytes from butyrate, their main fuel source, and this results in lowering serum glucose and improving insulin sensitivity (72). This potential mechanism may contribute to the reduction of muscle glycogen store reported in the present study, since glycogen storage depends on both carbohydrate availability and uptake (39). Because reduction of glycogen content affects muscle fatigue in both in vivo and ex vivo conditions (51), the muscle glycogen depletion observed in ATB mice could be one of the key mechanisms to explain the muscle endurance reduction in these animals. Furthermore, the restoration of glycogen content to values close to CTL mice after natural reseeded reinforced this hypothesis. Interestingly, we demonstrated the same muscle glycogen level reduction in GF mice, another recognized model of gut microbiota depletion, compared with GF-reseeded mice (data not shown). All of these findings finally suggest that the reduction of energetic substrate availability, especially glucose, because of intestinal microbiota disruption could induce a reduction of muscle glycogen storage to maintain glucose homeostasis, translating in skeletal muscle endurance impairment.

To conclude, our results indicate for the first time that gut bacteria are critical for optimal muscle function in mice at least in part by altering glucose homeostasis regulation. How could we translate these finding in humans? The presence of a gut-muscle axis in the pathogenesis of age-related sarcopenia in humans has been proposed recently based on very promising results (67). The interplay between microbiome and skeletal muscle has been highlighted by Siddhart and colleagues (64) who demonstrated that age-related changes of gut microbiome are associated with the physiological decline of musculoskeletal function. Future studies will be needed to identify the bacterial species and/or the underlying mechanisms and the putative metabolites that contribute to the functional link between gut microbiota and skeletal muscle. Our work opens promising perspectives to develop new therapeutic strategies

based on gut microbiota modulation for muscle-related diseases, muscle disuse, and sport training.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Genotoul Bioinformatics Facility, Toulouse Midi-Pyrenees (BioinfoGenotoul), for providing help, computing, and storage resources. We thank the animal staff from the METAMUS DMEM platform facility, which belongs to the "Montpellier Animal Facilities Network." We also acknowledge the MRI imaging facility, which is a part of the national bioimaging infrastructure supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04, Investments for the future).

#### GRANTS

The work was supported by INRA and Brittany Council and partially supported by an AlimH department grant. This work was also supported by the Centre National d'Etudes Spatiales.

#### DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

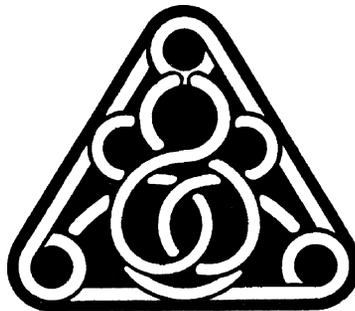
C.K.-R. conceived and designed research; K.N., M.J., B.G., N.B., B.V., M.P., L.L.-O., C.B., P.L., and C.K.-R. performed experiments; K.N., M.J., B.G., B.V., L.L.-O., O.R., M.M., V.O., P.L., F.D., and C.K.-R. analyzed data; K.N., M.J., B.G., O.R., M.M., A.B., V.O., P.L., F.D., and C.K.-R. interpreted results of experiments; K.N., M.J., P.L., and C.K.-R. prepared figures; K.N., A.B., V.O., F.D., and C.K.-R. drafted manuscript; K.N., B.G., A.B., V.O., F.D., and C.K.-R. edited and revised manuscript; K.N., M.J., B.G., M.P., L.L.-O., C.B., O.R., M.M., A.B., V.O., P.L., F.D., and C.K.-R. approved final version of manuscript.

#### REFERENCES

- Adamo KB, Graham TE. Comparison of traditional measurements with macroglycogen and proglycogen analysis of muscle glycogen. *J Appl Physiol* (1985) 84: 908–913, 1998. doi:10.1152/jappl.1998.84.3.908.
- Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15718–15723, 2004. doi:10.1073/pnas.0407076101.
- Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 979–984, 2007. doi:10.1073/pnas.0605374104.
- Bindels LB, Beck R, Schakman O, Martin JC, De Backer F, Sohet FM, Dewulf EM, Pachikian BD, Neyrinck AM, Thissen J-P, Verrax J, Calderon PB, Pot B, Grangette C, Cani PD, Scott KP, Delzenne NM. Restoring specific lactobacilli levels decreases inflammation and muscle atrophy markers in an acute leukemia mouse model. *PLoS One* 7: e37971, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0037971.
- Bindels LB, Delzenne NM. Muscle wasting: the gut microbiota as a new therapeutic target? *Int J Biochem Cell Biol* 45: 2186–2190, 2013. doi:10.1016/j.biocel.2013.06.021.
- Bindels LB, Neyrinck AM, Salazar N, Taminiau B, Druart C, Muccioli GG, François E, Blecker C, Richel A, Daube G, Mahillon J, de los Reyes-Gavilán CG, Cani PD, Delzenne NM. Non digestible oligosaccharides modulate the gut microbiota to control the development of leukemia and associated cachexia in mice. *PLoS One* 10: e0131009, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0131009.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911–917, 1959. doi:10.1139/y59-099.
- Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, Mills DA, Caporaso JG. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods* 10: 57–59, 2013. doi:10.1038/nmeth.2276.
- Boursier J, Mueller O, Barret M, Machado M, Fizanne L, Araujo-Perez F, Guy CD, Seed PC, Rawls JF, David LA, Hunault G, Oberti F, Calès P, Diehl AM. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology* 63: 764–775, 2016. doi:10.1002/hep.28356.
- Britto FA, Cortade F, Belloum Y, Blaquièrre M, Gallot YS, Docquier A, Pagano AF, Jublanc E, Bendridi N, Koehlin-Ramonatxo C, Chabi B, Francaux M, Casas F, Freyssen D, Rieusset J, Giorgetti-Peraldi S, Carnac G, Ollendorff V, Favier FB. Glucocorticoid-dependent REDD1 expression reduces muscle metabolism to enable adaptation under energetic stress. *BMC Biol* 16: 65, 2018. doi:10.1186/s12915-018-0525-4.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611–622, 2009. doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
- Catoire M, Alex S, Paraskevopoulos N, Mattijssen F, Evers-van Gogh I, Schaart G, Jeppesen J, Kneppers A, Mensink M, Voshol PJ, Olivecrona G, Tan NS, Hesselink MKC, Berbée JF, Rensen PCN, Kalkhoven E, Schrauwen P, Kersten S. Fatty acid-inducible ANGPTL4 governs lipid metabolic response to exercise. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: E1043–E1052, 2014. doi:10.1073/pnas.1400889111.
- Chang H, Kwon O, Shin M-S, Kang GM, Leem YH, Lee CH, Kim SJ, Roh E, Kim H-K, Youn B-S, Kim M-S. Role of Angptl4/Fiaf in exercise-induced skeletal muscle AMPK activation. *J Appl Physiol* (1985) 125: 715–722, 2018. doi:10.1152/jappphysiol.00984.2016.
- Chen Y-M, Wei L, Chiu Y-S, Hsu Y-J, Tsai T-Y, Wang M-F, Huang C-C. Lactobacillus plantarum TWK10 supplementation improves exercise performance and increases muscle mass in mice. *Nutrients* 8: 205, 2016. doi:10.3390/nu8040205.
- Clark A, Mach N. The crosstalk between the gut microbiota and mitochondria during exercise. *Front Physiol* 8: 319, 2017. doi:10.3389/fphys.2017.00319.
- Clarke SF, Murphy EF, O'Sullivan O, Lucey AJ, Humphreys M, Hogan A, Hayes P, O'Reilly M, Jeffery IB, Wood-Martin R, Kerins DM, Quigley E, Ross RP, O'Toole PW, Molloy MG, Falvey E, Shanahan F, Cotter PD. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut* 63: 1913–1920, 2014. doi:10.1136/gutjnl-2013-306541.
- Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 148: 1258–1270, 2012. doi:10.1016/j.cell.2012.01.035.
- Cresci GA, Thangaraju M, Mellinger JD, Liu K, Ganapathy V. Colonic gene expression in conventional and germ-free mice with a focus on the butyrate receptor GPR109A and the butyrate transporter SLC5A8. *J Gastrointest Surg* 14: 449–461, 2010. doi:10.1007/s11605-009-1045-x.
- Demangel R, Treffel L, Py G, Brioché T, Pagano AF, Bareille MP, Beck A, Pessemesse L, Candau R, Gharib C, Chopard A, Millet C. Early structural and functional signature of 3-day human skeletal muscle disuse using the dry immersion model. *J Physiol* 595: 4301–4315, 2017. doi:10.1113/JP273895.
- Derbré F, Droguet M, Léon K, Troadec S, Pennec J-P, Giroux-Metges M-A, Rannou F. Single muscle immobilization decreases single-fibre myosin heavy chain polymorphism: possible involvement of p38 and JNK MAP kinases. *PLoS One* 11: e0158630, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0158630.
- Dinan TG, Cryan JF. Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *J Physiol* 595: 489–503, 2017. doi:10.1113/JP273106.
- Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab* 17: 162–184, 2013. doi:10.1016/j.cmet.2012.12.012.
- Escudé F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Hernandez-Raquet G, Combes S, Pascal G. FROGS: find, rapidly, OTUs with Galaxy solution. *Bioinformatics* 34: 1287–1294, 2018. doi:10.1093/bioinformatics/btx791.
- Evans WJ. Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity. *Am J Clin Nutr* 91: 1123S–1127S, 2010. doi:10.3945/ajcn.2010.28608A.
- Fröhlich EE, Farzi A, Mayerhofer R, Reichmann F, Jačan A, Wagner B, Zinsler E, Bordag N, Magnes C, Fröhlich E, Kashofer K, Gorkiewicz G, Holzer P. Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication. *Brain Behav Immun* 56: 140–155, 2016. doi:10.1016/j.bbi.2016.02.020.
- Furet J-P, Firmesse O, Gourmelon M, Bridonneau C, Tap J, Mondot S, Doré J, Corthier G. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol Ecol* 68: 351–362, 2009. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00671.x.
- Gonglach AR, Ade CJ, Bemben MG, Larson RD, Black CD. Muscle pain as a regulator of cycling intensity: effect of caffeine ingestion. *Med Sci Sports Exerc* 48: 287–296, 2016. doi:10.1249/MSS.0000000000000767.

28. Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5755–5761, 2001. doi:10.1210/jcem.86.12.8075.
29. Guo X, Xia X, Tang R, Zhou J, Zhao H, Wang K. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Lett Appl Microbiol* 47: 367–373, 2008. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02408.x.
30. Hansen TH, Gøbel RJ, Hansen T, Pedersen O. The gut microbiome in cardio-metabolic health. *Genome Med* 7: 33, 2015. doi:10.1186/s13073-015-0157-z.
31. Hermansen L, Eklom B, Saltin B. Cardiac output during submaximal and maximal treadmill and bicycle exercise. *J Appl Physiol* 29: 82–86, 1970. doi:10.1152/jappl.1970.29.1.82.
32. Hermansen L, Hultman E, Saltin B. Muscle glycogen during prolonged severe exercise. *Acta Physiol Scand* 71: 129–139, 1967. doi:10.1111/j.1748-1716.1967.tb03719.x.
33. Houghton MJ, Kerimi A, Mouly V, Tumova S, Williamson G. Gut microbiome catabolites as novel modulators of muscle cell glucose metabolism. *FASEB J* 33: 1887–1898, 2018. doi:10.1096/fj.201801209R.
34. Hsu YJ, Chiu CC, Li YP, Huang WC, Huang YT, Huang CC, Chuang HL. Effect of intestinal microbiota on exercise performance in mice. *J Strength Cond Res* 29: 552–558, 2015. doi:10.1519/JSC.0000000000000644.
35. Jäger R, Shields KA, Lowery RP, De Souza EO, Partl JM, Hollmer C, Purpura M, Wilson JM. Probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 reduces exercise-induced muscle damage and increases recovery. *PeerJ* 4: e2276, 2016. doi:10.7717/peerj.2276.
36. Jäger S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 12017–12022, 2007. doi:10.1073/pnas.0705070104.
37. Janssen AWF, Kersten S. Potential mediators linking gut bacteria to metabolic health: a critical view. *J Physiol* 595: 477–487, 2017. doi:10.1113/JP272476.
38. Jansson E. Acid soluble and insoluble glycogen in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 113: 337–340, 1981. doi:10.1111/j.1748-1716.1981.tb06904.x.
39. Jensen TE, Richter EA. Regulation of glucose and glycogen metabolism during and after exercise. *J Physiol* 590: 1069–1076, 2012. doi:10.1113/jphysiol.2011.224972.
40. Levy LB, Welch AA. Implications of skeletal muscle loss for public health nutrition messages: a brief report. *Proc Nutr Soc* 74: 426–429, 2015. doi:10.1017/S0029665115002116.
41. Linninge C, Ahrné S, Molin G. Pre-treatment with antibiotics and *Escherichia coli* to equalize the gut microbiota in conventional mice. *Antonie van Leeuwenhoek* 107: 149–156, 2015. doi:10.1007/s10482-014-0312-3.
42. Lundberg R, Toft MF, August B, Hansen AK, Hansen CHF. Antibiotic-treated versus germ-free rodents for microbiota transplantation studies. *Gut Microbes* 7: 68–74, 2016. doi:10.1080/19490976.2015.1127463.
43. Lunde PK, Dahlstedt AJ, Bruton JD, Lännergren J, Thorén P, Sejersted OM, Westerblad H. Contraction and intracellular Ca(2+) handling in isolated skeletal muscle of rats with congestive heart failure. *Circ Res* 88: 1299–1305, 2001. doi:10.1161/hh1201.092041.
44. MacDonald PE, El-Kholy W, Riedel MJ, Salapatek AMF, Light PE, Wheeler MB. The multiple actions of GLP-1 on the process of glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 51, Suppl 3: S434–S442, 2002. doi:10.2337/diabetes.51.2007.S434.
45. Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27: 2957–2963, 2011. doi:10.1093/bioinformatics/btr507.
46. Mahé F, Rognes T, Quince C, de Vargas C, Dunthorn M. Swarm v2: highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ* 3: e1420, 2015. doi:10.7717/peerj.1420.
47. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal* 17: 10–12, 2011. doi:10.14806/ej.17.1.200.
48. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8: e61217, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0061217.
49. Nakanishi Y, Murashima K, Ohara H, Suzuki T, Hayashi H, Sakamoto M, Fukasawa T, Kubota H, Hosono A, Kono T, Kaminogawa S, Benno Y. Increase in terminal restriction fragments of Bacteroidetes-derived 16S rRNA genes after administration of short-chain fructooligosaccharides. *Appl Environ Microbiol* 72: 6271–6276, 2006. doi:10.1128/AEM.00477-06.
50. Olfert IM, Howlett RA, Tang K, Dalton ND, Gu Y, Peterson KL, Wagner PD, Breen EC. Muscle-specific VEGF deficiency greatly reduces exercise endurance in mice. *J Physiol* 587: 1755–1767, 2009. doi:10.1113/jphysiol.2008.164384.
51. Ørtenblad N, Westerblad H, Nielsen J. Muscle glycogen stores and fatigue. *J Physiol* 591: 4405–4413, 2013. doi:10.1113/jphysiol.2013.251629.
52. Palaferri Schieber AM, Lee YM, Chang MW, Leblanc M, Collins B, Downes M, Evans RM, Ayres JS. Disease tolerance mediated by commensal *E. coli* via inflammasome and IGF-1 signaling. *Science* 350: 558–563, 2015. doi:10.1126/science.aac6468.
53. Piedimonte A, Benedetti F, Carlino E. Placebo-induced decrease in fatigue: evidence for a central action on the preparatory phase of movement. *Eur J Neurosci* 41: 492–497, 2015. doi:10.1111/ejn.12806.
54. Ploquin C, Chabi B, Fouret G, Vernus B, Feillet-Coudray C, Coudray C, Bonniou A, Ramonaxo C. Lack of myostatin alters intermyofibrillar mitochondria activity, unbalances redox status, and impairs tolerance to chronic repetitive contractions in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302: E1000–E1008, 2012. doi:10.1152/ajpendo.00652.2011.
55. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schwaer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41: D590–D596, 2013. doi:10.1093/nar/gks1219.
56. Reikvam DH, Erofeev A, Sandvik A, Grčic V, Jahnsen FL, Gaustad P, McCoy KD, Macpherson AJ, Meza-Zepeda LA, Johansen F-E. Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. *PLoS One* 6: e17996, 2011. doi:10.1371/journal.pone.0017996.
57. Robciuc MR, Skrobuk P, Anisimov A, Olkkonen VM, Alitalo K, Eckel RH, Koistinen HA, Jauhainen M, Ehnholm C. Angiotensin-like 4 mediates PPAR delta effect on lipoprotein lipase-dependent fatty acid uptake but not on beta-oxidation in myotubes. *PLoS One* 7: e46212, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0046212.
58. Rodrigues RR, Greer RL, Dong X, DSouza KN, Gurung M, Wu JY, Morgun A, Shulzhenko N. Antibiotic-induced alterations in gut microbiota are associated with changes in glucose metabolism in healthy mice. *Front Microbiol* 8: 2306, 2017. doi:10.3389/fmicb.2017.02306.
59. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4: e2584, 2016. doi:10.7717/peerj.2584.
60. Ryall JG, Gregorevic P, Plant DR, Sillence MN, Lynch GS. Beta 2-agonist fenoterol has greater effects on contractile function of rat skeletal muscles than clenbuterol. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R1386–R1394, 2002. doi:10.1152/ajpregu.00324.2002.
61. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3: 1101–1108, 2008. doi:10.1038/nprot.2008.73.
62. Schuijt TJ, Lankelma JM, Scicluna BP, de Sousa e Melo F, Roelofs JJ, de Boer JD, Hoogendijk AJ, de Beer R, de Vos A, Belzer C, de Vos WM, van der Poll T, Wiersinga WJ. The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia. *Gut* 65: 575–583, 2016. doi:10.1136/gutjnl-2015-309728.
63. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 90: 859–904, 2010. doi:10.1152/physrev.00045.2009.
64. Siddharth J, Chakrabarti A, Pannérec A, Karaz S, Morin-Rivron D, Masoodi M, Feige JN, Parkinson SJ. Aging and sarcopenia associate with specific interactions between gut microbes, serum biomarkers and host physiology in rats. *Aging (Albany NY)* 9: 1698–1720, 2017. doi:10.18632/aging.101262.
65. Steves CJ, Bird S, Williams FM, Spector TD. The microbiome and musculoskeletal conditions of aging: a review of evidence for impact and potential therapeutics. *J Bone Miner Res* 31: 261–269, 2016. doi:10.1002/jbmr.2765.
66. Talmadge RJ, Roy RR. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J Appl Physiol (1985)* 75: 2337–2340, 1993. doi:10.1152/jappl.1993.75.5.2337.
67. Ticinesi A, Lauretani F, Milani C, Nouvenne A, Tana C, Del Rio D, Maggio M, Ventura M, Meschi T. Aging gut microbiota at the crossroad between nutrition, physical frailty, and sarcopenia: is there a gut-muscle axis? *Nutrients* 9: E1303, 2017. doi:10.3390/nu9121303.

68. Tolhurst G, Heffron H, Lam YS, Parker HE, Habib AM, Diakogiannaki E, Cameron J, Grosse J, Reimann F, Gribble FM. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes* 61: 364–371, 2012. doi:10.2337/db11-1019.
69. Varian BJ, Goureshetti S, Poutahidis T, Lakritz JR, Levkovich T, Kwok C, Teliousis K, Ibrahim YM, Mirabal S, Erdman SE. Beneficial bacteria inhibit cachexia. *Oncotarget* 7: 11803–11816, 2016. doi:10.18632/oncotarget.7730.
70. Yan H, Diao H, Xiao Y, Li W, Yu B, He J, Yu J, Zheng P, Mao X, Luo Y, Zeng B, Wei H, Chen D. Gut microbiota can transfer fiber characteristics and lipid metabolic profiles of skeletal muscle from pigs to germ-free mice. *Sci Rep* 6: 31786, 2016. doi:10.1038/srep31786.
71. Yu LC-H, Wang J-T, Wei S-C, Ni Y-H. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: from physiology to pathology. *World J Gastrointest Pathophysiol* 3: 27–43, 2012. doi:10.4291/wjgp.v3.i1.27.
72. Zarrinpar A, Chaix A, Xu ZZ, Chang MW, Marotz CA, Saghatelian A, Knight R, Panda S. Antibiotic-induced microbiome depletion alters metabolic homeostasis by affecting gut signaling and colonic metabolism. *Nat Commun* 9: 2872, 2018. doi:10.1038/s41467-018-05336-9.



## **DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

### **Avant-propos :**

En s'appuyant sur des modèles précliniques murins, l'objectif général de ce travail de thèse était de comprendre dans quelles mesures l'hypoactivité affecte le métabolisme du fer et le microbiote intestinal et d'identifier les mécanismes physiologiques sous-jacents. Nos travaux de recherche se sont également tout particulièrement intéressés au rôle joué par le muscle squelettique dans les modifications du métabolisme du fer et du microbiote intestinal, mais également à l'inverse sur les conséquences de ces changements sur la structure et le métabolisme du muscle. Cette dernière partie de discussion générale a pour ambition de synthétiser les résultats essentiels obtenus dans ce travail de thèse et d'ouvrir de nouveaux champs de discussions et de nouvelles perspectives de recherche.

## **I. L'hepcidine joue un rôle clé dans la redistribution du fer en réponse à l'hypoactivité**

### **A. Le fer est redistribué vers la rate dans les premiers jours d'exposition à l'hypoactivité**

Les études antérieures de la littérature montraient que la biodisponibilité du fer dans le compartiment sanguin est réduite en réponse à l'hypoactivité en étant associée à un stockage tissulaire accru à court et long terme (Morgan et al., 2012; Ryan et al., 2016; Smith, 2002; Smith et al., 2005; Zwart et al., 2009, 2013). Toutefois, ces études présentaient certaines limites. Aucune ne mesurait la saturation en transferrine qui constitue pourtant l'indicateur clinique de référence pour juger véritablement de la biodisponibilité du fer dans l'organisme (Elsayed et al., 2016). De plus, la localisation dans l'organisme du stockage accru de fer en situation d'hypoactivité restait inconnue. Dans notre étude n°1, nous répondons à ces limites avec notre modèle de suspension par la queue chez le rongeur et démontrons de manière définitive que l'hypoactivité induit à court terme une réduction de la biodisponibilité en fer, caractérisées par des diminutions concomitantes des concentrations sériques en fer et de la saturation en transferrine. Où ce fer a-t-il été préférentiellement stocké ? Dans la rate, le foie étant préservé de toute surcharge.

Riche en macrophages, la rate constitue un organe essentiel pour dégrader les érythrocytes sénescents faisant de cette dernière un important lieu de stockage pour le fer

(Korolnek and Hamza, 2015; Soares and Hamza, 2016). Cette surcharge en fer splénique peut être en partie due à une accélération de l'érythrophagocytose puisque l'hypoactivité réduit très rapidement la masse de globules rouges (De Santo et al., 2005). Les macrophages constituent des cellules pouvant stocker ou distribuer le fer dans l'organisme, afin notamment d'assurer l'approvisionnement en fer à la moelle osseuse rouge pour l'érythropoïèse (Nairz et al., 2017). Résultat non publié, nous observons dans cette étude n°1, que la concentration circulante en EPO est d'ailleurs diminuée après 7 jours d'hypoactivité. Ce résultat suggère qu'une séquestration du fer par les macrophages spléniques pourrait se produire en réponse à une demande réduite en fer par la moelle osseuse rouge, et pouvant être potentiellement accrue par une érythrophagocytose concomitante comme évoqué précédemment.

En étudiant la cinétique des processus (Etude n°2 vs Etude n°1), nous notons que la rate n'est plus surchargée en fer à 14 jours, malgré une réduction persistante de la biodisponibilité du fer. Ceci questionne donc sur la redistribution de ce métal en condition d'hypoactivité à moyen terme et suggère d'autres lieux organiques de stockage. Le foie et les muscles posturaux ne seraient pas les cibles de cette surcharge au regard de nos résultats. De manière intéressante, une étude récente a démontré que 28 jours de suspension par la queue chez des souris augmentent les concentrations en fer dans l'os, mais aussi dans le foie (Xu et al., 2017). L'ensemble de ces données souligne finalement que la redistribution du fer se produisant en hypoactivité est dynamique dans le temps et affecte de manière différenciée nos organes. La séquestration de fer splénique se produisant à court terme pourrait finalement constituer un mécanisme de protection préservant d'autres organes comme le foie et l'os d'une surcharge délétère en fer, ce mécanisme n'étant à priori plus efficace lorsque l'exposition à l'hypoactivité se prolonge. Des recherches complémentaires seront donc indispensables pour mieux caractériser la redistribution du fer à court et long terme, et vérifier si ce phénomène est également visible chez l'homme en hypoactivité. Au-delà des cinétiques de redistribution du fer et des lieux de stockage, l'étape suivante consiste à comprendre les mécanismes sous-jacents qui régulent ces modifications en conditions d'hypoactivité et nos études présentent l'hepcidine comme étant au cœur du processus.

## **B. L'hepcidine, une hormone clé**

Nos résultats montrent clairement que l'hepcidine joue un rôle clé dans la redistribution du fer dans un organisme exposé à l'hypoactivité que ce soit à court ou moyen

terme. A plus long terme, Xu et al. (2017) notent que cette transcription hépatique est toujours augmentée après 28 jours de suspension. Cette augmentation peut en grande partie expliquer la réduction de la biodisponibilité en fer constatée en réponse à l'hypoactivité en limitant notamment l'absorption du fer par les entérocytes via la dégradation de la ferroportine ou en favorisant la séquestration du fer au sein des macrophages de la rate.

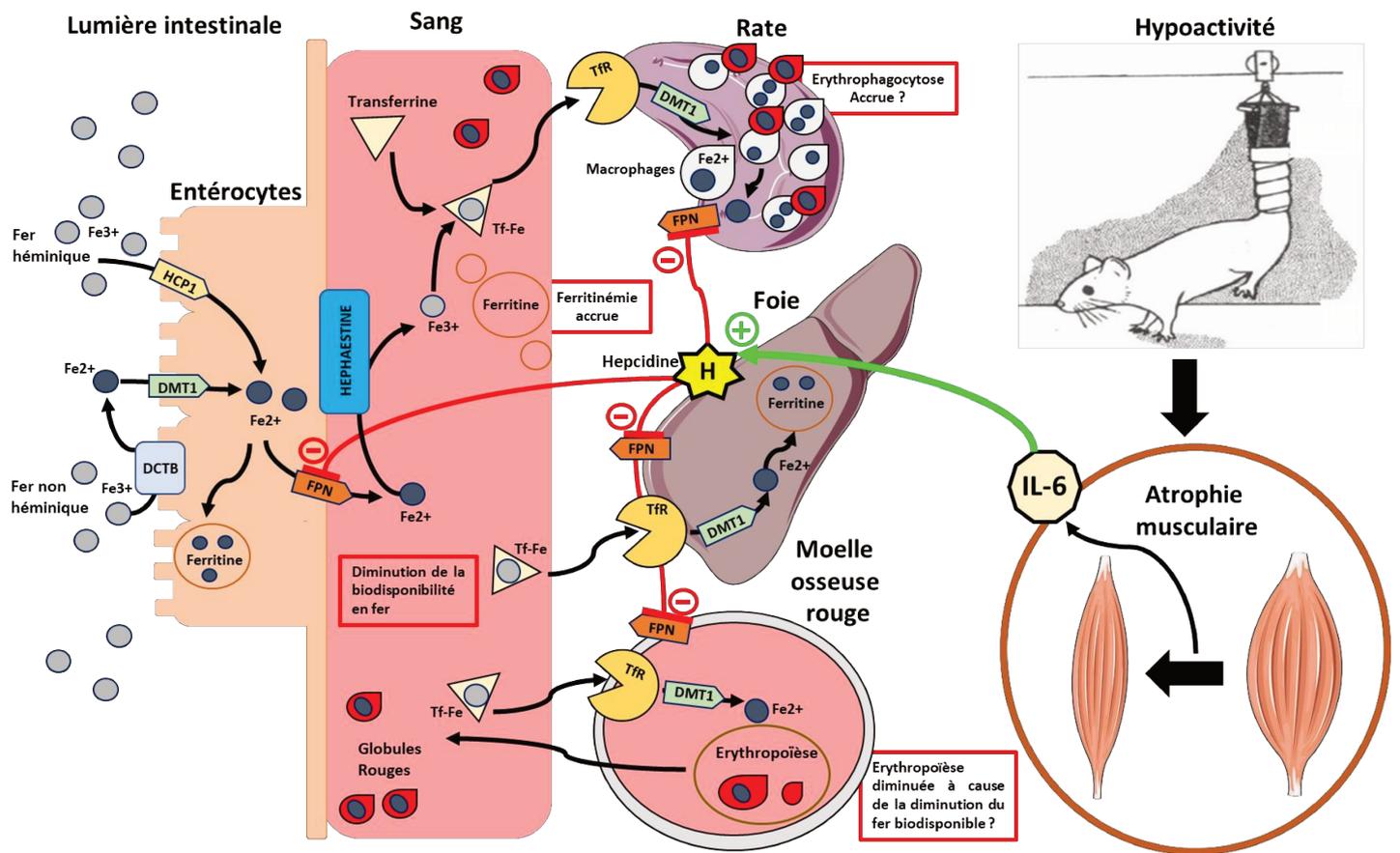
Les mécanismes régulant cette transcription activée en condition d'hypoactivité étaient largement méconnus et ce travail de thèse permet d'en discuter certains. Tout d'abord, nous notons que l'augmentation de la synthèse d'hepcidine n'est pas associée à court terme à des changements de l'activité des voies de signalisation BMP/SMAD et MAPK/ERK. Ces résultats apparaissent cohérents dans la mesure où les stocks en fer hépatiques demeurent inchangés et que la saturation en transferrine diminue après 7 et 14 jours de suspension par la queue. Un état pro-inflammatoire, et plus spécifiquement une augmentation des concentrations sanguines d'IL-6, est également reconnue pour stimuler la synthèse d'hepcidine via l'activation de la voie JAK/STAT3 (Zhao et al., 2013). De manière intéressante, l'activité du facteur de transcription STAT3 augmente au niveau hépatique chez nos rongeurs après 7 jours de suspension. Après 14 jours de suspension par la queue, cette activation de la voie IL-6/STAT3 ne perdure pas et les voies BMP/SMAD et MAPK/ERK demeurent toujours inchangés comparativement aux animaux contrôles. De manière intéressante, Xu et al. constatent une transcription hépatique plus importante de BMP6 en parallèle de l'augmentation d'hepcidine après 28 jours de suspension par la queue. Ceci suggère qu'une activation de la voie BMP/SMAD se produit en réponse au stockage hépatique en fer à plus long terme (Xu et al., 2017). L'ensemble de ces données supportent donc le fait que l'augmentation de la transcription d'hepcidine en réponse à l'hypoactivité est due à l'élévation des niveaux d'IL-6 circulants dans les premiers jours d'hypoactivité puis qu'ensuite, d'autres mécanismes prennent le relais.

### **C. Quel rôle joue le muscle squelettique dans les altérations du métabolisme du fer en situation d'hypoactivité ?**

Le rôle de l'hypoactivité sur les niveaux circulants d'IL-6 et sur la transcription d'hepcidine au niveau hépatique associé à la voie IL-6/STAT3 (Bosutti et al., 2008; Felix et al., 2004; Mutin-Carnino et al., 2014) pose la question du lien avec le muscle squelettique. En effet, nous constatons parallèlement une augmentation de la transcription d'IL-6 dans le

muscle gastrocnémien atrophié confirmant les résultats obtenus dans de précédentes études (Caron et al., 2009; Kwon et al., 2015a). Ainsi, nous proposons le mécanisme suivant de régulation (Illustration n°10) : l'atrophie induite par l'hypoactivité favorise un état inflammatoire systémique et stimule par conséquent la synthèse hépatique d'hepcidine, responsable de la redistribution du fer au sein de l'organisme. Cependant, le reconditionnement intermittent, pourtant efficace pour limiter l'atrophie musculaire pendant 14 jours d'hypoactivité, n'a induit aucun effet préventif sur le métabolisme du fer. Cette absence totale d'effet sur le versant ferrique dans cette condition expérimentale réfuterait donc l'hypothèse d'un dialogue entre le muscle atrophié et le foie synthétisant l'hepcidine en situation d'hypoactivité. Toutefois, notre étude présente un certain nombre de limites et ne permet pas de répondre à toutes les interrogations concernant un dialogue potentiel muscle-foie dans la régulation du métabolisme du fer. En effet, le reconditionnement intermittent proposé est efficace sur le muscle soléaire, mais n'exerce aucun effet préventif sur le muscle gastrocnémien qui constitue pourtant une masse musculaire environ 20 fois plus importante chez le rat. Ainsi, nous ne pouvons exclure que la contre-mesure proposée exerce un effet préventif trop limité sur l'ensemble de la masse musculaire atrophiée en réponse à l'hypoactivité pour agir sur la régulation du métabolisme du fer, et pour permettre de répondre à notre hypothèse initiale. Par ailleurs, nous avons émis l'hypothèse que le relargage d'IL-6 dans la circulation sanguine joue un rôle dans la synthèse d'hepcidine. Or, après 14 jours de suspension, la voie IL-6/STAT3 n'est plus activée dans le foie des animaux suspendus, et ce, indépendamment du reconditionnement intermittent. Nous ne pouvons donc exclure l'hypothèse que le reconditionnement intermittent exerce un effet préventif sur cette synthèse d'hepcidine dans les premiers jours d'hypoactivité, caractérisés par un état catabolique et inflammatoire intense au niveau musculaire. Cet effet s'estomperait alors au bout de 14 jours suivant la réduction progressive de l'état inflammatoire systémique et musculaire.

### Illustration n°10 : Proposition de mécanisme impliquant le muscle squelettique dans les dérégulations du métabolisme du fer à court terme en situation d'hypoactivité



1. L'atrophie musculaire induite par la suspension provoque une augmentation des niveaux circulants d'IL-6.
2. Cette interleukine stimule la transcription hépatique d'hepcidine en activant la voie de régulation IL-6/STAT-3.
3. La surexpression d'hepcidine associée induit la dégradation de la ferroportine bloquant ainsi l'export du fer vers le compartiment sanguin.
4. Ce mécanisme conduit alors à une diminution de la biodisponibilité en fer et augmente le stockage en fer dans la rate.
5. L'érythropoïèse pourrait alors être diminuée en raison d'un manque de fer disponible pour former le cofacteur hème tandis que l'accélération de l'érythrophagocytose exacerbe le stockage en fer splénique.

## II. Le microbiote intestinal joue un rôle essentiel sur la fonction musculaire: implication du métabolisme du glucose et perspectives de recherche en situation d'hypoactivité

Le microbiote intestinal est un organe désormais bien identifié pour interagir avec les organes de son hôte tels que le cerveau, le foie ou encore les poumons (Boursier et al., 2016; Dinan and Cryan, 2017; Schuijt et al., 2016). Lors du démarrage de ce travail de thèse, l'hypothèse d'un dialogue entre le microbiote intestinal et le muscle squelettique commençait à émerger dans la littérature scientifique (Bindels and Delzenne, 2013) mais les mécanismes restaient inconnus. Dans un premier temps, l'objectif de l'étude n°3 a été de déterminer l'influence directe du microbiote intestinal et de sa modulation sur le phénotype contractile et métabolique du muscle squelettique, et ce indépendamment de l'hypoactivité.

### A. Microbiote et Muscle squelettique : un lien fonctionnel et des premiers éléments de compréhension des mécanismes sous-jacents

Il est intéressant de noter ici que notre étude n°3 est la 1<sup>ère</sup> à montrer un lien spécifique entre microbiote et l'endurance du muscle squelettique, alors que des études récentes montrent un lien global entre microbiote et performance de course ou de nage (Hsu et al., 2015; Lahiri et al., 2019; Okamoto et al., 2019). En effet, l'originalité de ce travail réside dans l'évaluation des propriétés contractiles du muscle EDL en condition *ex-vivo* qui permet d'exclure, dans la réduction de l'endurance observée, des facteurs non spécifiques au muscle tels que la fatigue centrale, le système cardio-respiratoire ou la réduction du transport de l'oxygène. De manière intéressante, le réensemencement naturel permettant la restauration de la flore bactérienne normalise les effets de déplétion induits par le traitement antibiotique. Toutes ces données suggèrent donc que le microbiote intestinal affecte directement l'endurance du muscle squelettique posant la question des mécanismes sous-jacents.

Dans les premières hypothèses de mécanismes, l'induction d'une atrophie musculaire en cas d'absence de bactéries intestinales peut être discutée. En effet, des études récentes constatent que la masse en valeur absolue ou relative de certains muscles des membres inférieurs est légèrement réduite après un traitement antibiotique (Okamoto et al., 2019) ou chez des souris axéniques (Hsu et al., 2015; Lahiri et al., 2019). Dans notre étude, nous notons des résultats similaires au niveau des muscles gastrocnémien et quadriceps avec des poids en

valeur absolue et relative légèrement inférieurs à ceux de souris contrôles. Toutefois, conclure que le microbiote intestinal diminue la masse musculaire peut être une mauvaise interprétation. En effet, dans les situations de déplétion bactérienne, que ce soit par antibiotiques ou chez des souris axéniques, le caecum des souris est hypertrophié de manière très conséquente (Linninge et al., 2015). En l'absence de bactéries, le mucus s'accumule dans cette partie de l'intestin, ce qui provoque son grossissement (Linninge et al., 2015). Dans notre étude, le caecum voit sa masse multipliée par 6 chez les souris présentant une déplétion bactérienne. Si l'on soustrait cette masse caecale du poids des souris, nous constatons que les poids relatifs des gastrocnémien et quadriceps ne diffèrent plus entre les animaux contrôles et traités aux antibiotiques. Ce constat questionne les méthodologies qui peuvent être utilisées aujourd'hui pour évaluer l'impact du microbiote intestinal sur le reste de l'organisme et plus précisément ici, sur l'étude du muscle. Pour confirmer si l'absence de microbiote intestinal n'induit pas directement d'atrophie musculaire, nous avons analysé la taille des fibres du quadriceps et les principales voies de signalisation régulant le turnover protéique dans le gastrocnémien. Nous notons que la surface de section transverse des fibres, l'activité du système ubiquitine-protéasome et la voie Akt-mTOR ne sont pas affectées par la déplétion du microbiote intestinal chez nos souris. L'ensemble de ces données laisse penser que la modulation du microbiote n'impacte pas de manière significative les mécanismes cellulaires régulant la masse musculaire.

De même, les capacités oxydatives du muscle squelettique et le phénotype des fibres musculaires demeurent inchangées par la déplétion microbienne. Ce résultat apparaît cohérent dans la mesure où les souris ne présentent pas de réduction de leur VMA sur tapis, dont on sait qu'elle est conditionnée par la consommation maximale d'O<sub>2</sub> de l'organisme. Par contre, de manière intéressante, l'hypothèse d'un impact de la modulation du microbiote intestinal sur la biodisponibilité des substrats énergétiques au niveau musculaire est privilégiée par nos résultats obtenus sur les stocks en glycogène musculaire qui sont réduits après traitement antibiotique et normalisés par le réensemencement naturel. C'est un résultat original, confirmé dans un groupe de souris axéniques reçus au sein de notre laboratoire, qui ouvre des pistes mécanistiques (cf. Encadré n°11) par lesquels le microbiote intestinal impacterait l'endurance musculaire en jouant sur l'homéostasie glucidique.

En effet, le glycogène est un des principaux substrats énergétiques du muscle et est essentiel à sa capacité d'endurance en condition *in-vivo* et *ex-vivo* (Ørtenblad et al., 2013). La biodisponibilité de ce substrat est étroitement liée à l'homéostasie glucidique (Jensen and Richter, 2012). Or, nous constatons que la modulation du microbiote intestinal (déplétion/réensemencement) module l'expression de SGLT1, un transporteur du glucose au niveau de l'iléon (Röder et al., 2014) avec une réduction dans un premier temps puis une normalisation dans un second temps. Dans une étude récente, Zarrinpar et al. (2018) ont mis en évidence que la déplétion de la flore intestinale par les antibiotiques réduit la production bactérienne d'acides gras à chaîne courte (AGCC). Ces derniers constituent un substrat énergétique pour les colonocytes qui, en leur absence augmentent leur consommation de glucose pour assurer leurs propres besoins énergétiques. Ceci aurait pour effet direct de diminuer le transport du glucose de la barrière intestinale vers le compartiment sanguin et d'altérer l'homéostasie glucidique de l'organisme affectant de manière concomitante l'endurance musculaire. En ce sens, Okamoto et al. ont démontré récemment que la supplémentation en acétate, un AGCC, sur un microbiote déplété par antibiotiques limite efficacement la réduction de l'endurance de leurs animaux (Okamoto et al., 2019). D'ailleurs, les sportifs de haut niveau ayant des qualités aérobies plus développées que des personnes sédentaires présentent des concentrations en AGCC supérieures, notamment en acétate dans leur contenu fécal (Barton et al., 2018). Enfin, une étude récente souligne que le microbiote intestinal jouerait un rôle clé dans la production d'énergie en métabolisant le lactate produit à l'effort par le muscle squelettique (Scheiman et al., 2019). Plus spécifiquement, ces chercheurs montrent que les bactéries du genre *Veillonella* sont présentes en plus grande quantité chez les athlètes ayant réalisé les meilleures performances chronométriques au marathon de Boston en 2015. Pour confirmer le rôle de cette bactérie, ils ont gavé des souris conventionnelles avec cette bactérie. La performance des animaux sur un test d'endurance sur tapis a alors augmenté de 13% (Scheiman et al., 2019). Sur le plan mécanistique, ces bactéries joueraient un rôle clé pour métaboliser le lactate circulant sous forme d'AGCC. Le lactate est en effet produit en grande quantité à partir du glucose utilisé par le muscle pendant l'effort. Tout comme le foie métabolise le lactate sous forme de glucose dans le fameux cycle de Cori, ces chercheurs ont proposé ici que le lactate dans la circulation sanguine passerait la barrière intestinale et serait pris en charge par les bactéries *Veillonella* qui le métaboliseraient sous forme d'AGCC. Ces derniers seraient alors davantage disponibles pour la production

d'énergie des colonocytes et pourrait contribuer à augmenter la disponibilité en glucose dans l'organisme, permettant ainsi d'épargner le glycogène musculaire. Ces premières études confirment l'existence d'un lien microbiote-muscle squelettique et permettent d'envisager des premiers éléments mécanistiques, notamment autour du métabolisme du glucose. Des études s'en suivront qui rapidement dévoileront certainement d'autres voies de signalisations et des conditions d'amplification ou d'inhibition de ce nouvel axe inter-organes. Dans le contexte de cette thèse, l'étape suivante inscrit ce dialogue dans une condition spécifique, l'hypoactivité.

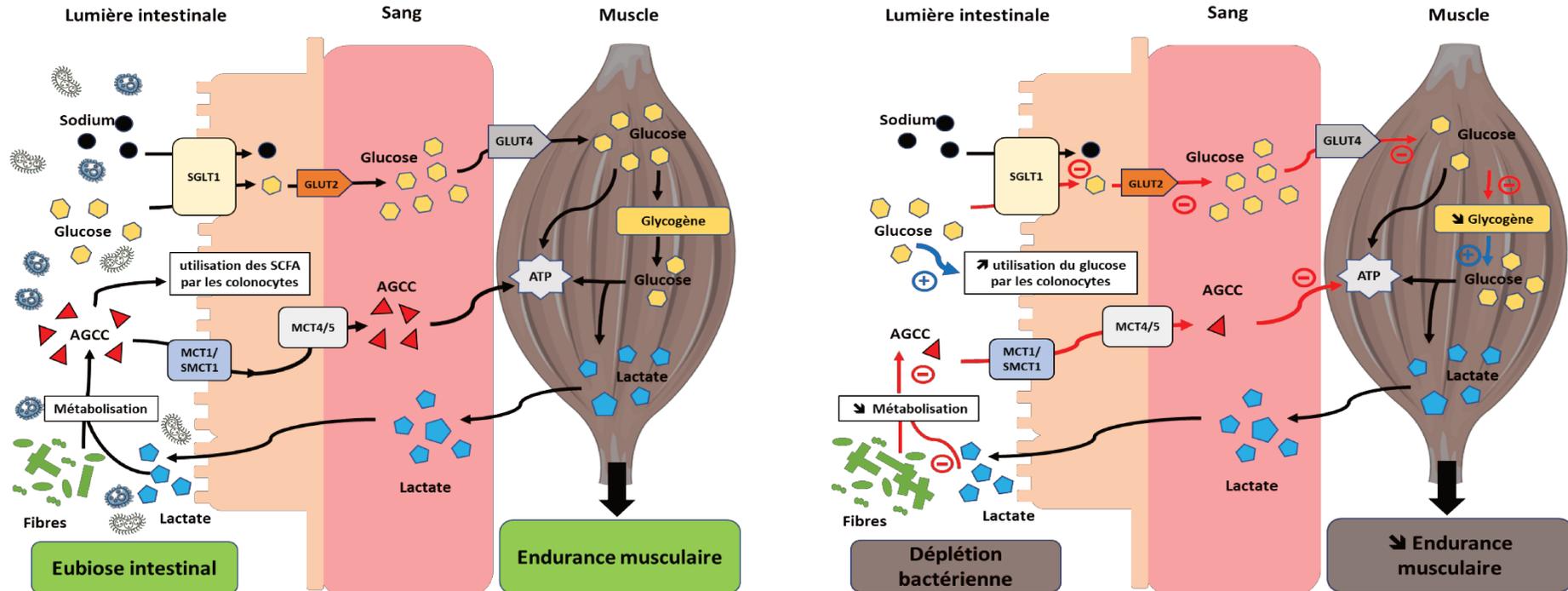
## B. Impact de l'hypoactivité sur le microbiote intestinal et problématiques méthodologiques

Comme évoqué dans notre revue de littérature, le mode de vie et l'activité physique jouent sur les diverses populations du microbiote intestinal. Des études très récentes, pour la plupart ayant été publiées durant ce travail de thèse, montrent que des rats ou souris suspendus par la queue présentent un ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* diminué et une proportion de *Bacteroidetes* gram-négatives augmentée comparativement à des animaux contrôles (Jin et al., 2018; Ritchie et al., 2015; Yang et al., 2018b). Ces modifications sont associées à des concentrations circulantes plus élevées en LPS et à un statut pro-inflammatoire plus important comparativement à des animaux contrôles suggérant le développement d'une endotoxémie (Li et al., 2015; Shi et al., 2017; Zhou et al., 2012). Ces phénomènes pourraient potentiellement être des éléments amplifiants les altérations musculaires associées à l'hypoactivité.

Durant ce travail de thèse, nous avons pour objectif initial de comparer les modifications du microbiote intestinal en réponse à l'hypoactivité chez le rongeur et l'homme afin d'explorer les interactions inter-organes en réponse à l'hypoactivité. Tout ceci afin de répondre à l'hypothèse d'une potentielle signature bactérienne commune associée à l'hypoactivité. Nous mettons en évidence dans les fèces que la proportion de *Bacteroidetes* est significativement augmentée ( $p < 0.05$ ) et que celle de *Firmicutes* tend à diminuer ( $p = 0.053$ ) pour le groupe suspendu par rapport au groupe contrôle en fin de protocole. Ces résultats sont en accord avec les précédentes études évoquées ayant utilisées une approche transversale pour étudier chez les rongeurs les effets de l'hypoactivité sur les différentes populations bactériennes (Jin et al., 2018; Ritchie et al., 2015; Yang et al., 2018b). Ils semblent

d'autant plus cohérents puisqu'à contrario de l'hypoactivité, l'exercice physique permet d'obtenir les résultats inverses sur les populations de *Bacteroidetes* et *Firmicutes* (Kang et al., 2014; Lambert et al., 2015; McFadzean, 2014). Toutefois, en analysant les compositions des microbiotes intestinaux avant et après le protocole de suspension, et en les comparant à un groupe contrôle non-suspendu, nous obtenons des résultats très différents. En effet, les différences intergroupes observées à 14 jours étaient en réalité dues à une modification du microbiote du groupe contrôle et non du groupe suspendu. Cette différence d'interprétation en fonction du caractère transversal ou longitudinal du traitement des données questionne les résultats préalablement obtenus dans la littérature concernant l'hypoactivité ou d'autres domaines d'études comme l'activité physique et les pathologies. L'évolution inattendue du microbiote du groupe contrôle résulte certainement dans notre étude d'une période d'acclimatation insuffisamment longue dans l'animalerie avant la mise en suspension (i.e. 2 semaines). Les conditions de transport et le changement d'environnement peuvent être des facteurs modulant la flore microbienne qui ne se stabiliserait qu'au bout de 9 semaines minimum selon Montonye et al. (2018). D'ailleurs, il est regrettable de constater que les précédentes études explorant les effets de l'hypoactivité chez le rongeur avaient également appliqué seulement 2 semaines d'acclimatation avant exposition à l'hypoactivité (Ritchie 2015) ou ne précisent simplement pas cette information dans leur partie méthodologique (Jin et al., 2018; Yang et al., 2018b). Ce constat souligne la nécessité de conduire davantage de travaux sur les effets de l'hypoactivité en imposant en amont un temps d'acclimatation plus important aux animaux pour que leur microbiote soit stabilisé avant de démarrer les procédures expérimentales. Ces aspects soulignent finalement que l'étude du microbiote intestinal, notamment dans des conditions spécifiques expérimentales telles que l'hypoactivité, demeure véritablement complexe et que la transposition des découvertes ainsi que les applications qui en découlent peuvent être dans certaines circonstances biaisées ou mal interprétées en raison de certaines difficultés méthodologiques que nous découvrons aujourd'hui de par la récente émergence de cette thématique dans la littérature scientifique. Si nous ne pourrions certainement pas valoriser ces dernières données, elles suggèrent dans le modèle murin des modifications du microbiote en condition d'hypoactivité, parallèlement aux troubles du métabolisme du fer. Un lien pourrait-il exister entre les deux dans cette condition physiopathologique ?

### Illustration n°11 : Proposition de mécanisme liant microbiote intestinal et endurance musculaire



**En condition d'eubiose**, les fibres sont métabolisées en acides gras à chaîne courte (AGCC). Les AGCC sont ensuite utilisés par les colonocytes comme substrats énergétiques ou diffusent dans le sang via les transporteurs de monocarboxylates 1/4/5 (MCT1/4/5) et le sodium dépendant monocarboxylate transporteurs 1 (SMCT1). Le glucose est transporté avec le sodium par le co-transporteur sodium glucose 1 (SGLT1), puis passe dans la circulation sanguine grâce au transporteur de glucose 2 (GLUT2). Il est ensuite pris en charge par le transporteur de glucose 4 (GLUT4) pour rentrer dans le muscle squelettique. Il est alors soit stocké sous forme de glycogène, soit utilisé pour créer l'énergie nécessaire à la contraction musculaire sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). A l'exercice, la demande en ATP augmente, le glucose et le glycogène sont alors mobilisés par la glycolyse pour fournir de l'ATP. De cette réaction est formé du lactate qui diffuse dans la circulation sanguine et rejoint la lumière intestinale afin d'être métabolisé en AGCC. La diffusion de ce dernier dans la circulation permet d'optimiser la fourniture énergétique

**Lorsque le microbiote est déplété**, il n'y a plus de bactéries présentes dans la lumière intestinale. Les fibres ne sont plus métabolisées en AGCC ce qui amène les colonocytes à consommer de manière substitutive du glucose. Ce dernier est donc moins disponible pour le muscle squelettique afin de maintenir une glycémie stable, ce qui a pour effet de diminuer les stocks de glycogène musculaire et hépatique. A l'effort, le glucose étant moins biodisponible, les stocks en glycogène déjà réduits sont mobilisés de manière plus importante pour fournir de l'énergie, ce qui a pour effet de les diminuer davantage. Le lactate est produit et rejoint la lumière intestinale mais n'est plus métabolisé en AGCC en raison de l'absence de bactéries. La production d'AGCC réduite, la diffusion de ces derniers au niveau sanguin est limitée. Ceci a pour conséquence d'altérer encore plus l'optimisation de la fourniture énergétique et de créer un cercle vicieux qui sera responsable à terme, d'une altération de l'endurance musculaire.

### III. Le métabolisme du fer et le microbiote intestinal interagissent-ils ?

#### A. Le microbiote intestinal module l'absorption du fer dans le tractus intestinal

Le microbiote intestinal est impliqué dans la régulation métabolique de nombreux minéraux dans l'organisme comme le calcium, le magnésium, le sélénium, le cuivre, le zinc, l'argent et le fer (Skrypnik and Suliburska, 2018). En outre, *in-vitro*, les microbes intestinaux sont capables d'augmenter la biodisponibilité en fer au sein de l'intestin (Saha et al., 2016). Plus spécifiquement, certaines espèces du genre des *Lactobacilli* arrivent notamment à réduire les ions  $Fe^{3+}$  en ions  $Fe^{2+}$  grâce à l'acide p-hydroxyphényl-lactique (González et al., 2017). Ce mécanisme modulerait ainsi l'absorption du fer puisque pour rappel, seul le fer sous forme ferreux ( $Fe^{2+}$ ) peut être absorbé par les entérocytes via le transporteur DMT1. Cependant, certains travaux *in-vivo* conduits chez le poulet et l'homme montrent que si une supplémentation avec différentes espèces de *Lactobacilli* modulent certaines populations bactériennes, aucun effet visible ne s'observe sur la biodisponibilité du fer au niveau systémique (Asemi and Esmailzadeh, 2013; Tako et al., 2014). Il est important de rappeler que le fer est principalement absorbé dans la partie proximale de l'intestin (i.e. duodénum), alors que la colonisation des bactéries dans le tractus intestinal est progressivement plus importante dans sa partie distale (i.e. colon). De manière intéressante, Deschemin *et al.* (2016) notent que les entérocytes du duodénum et du colon de souris axéniques présentent une faible expression de ferritine soulignant une capacité de stockage de fer réduite malgré une expression plus élevée de DMT1. D'ailleurs, le contenu caecal en fer est parallèlement plus important chez les souris axéniques. Lorsque les auteurs réensemencent ces animaux, ils observent une augmentation du contenu en ferritine et en ferroportine dans les entérocytes du duodénum et du colon traduisant une augmentation du stockage et de l'export du fer dans l'organisme. Mais dans le même temps, ni la biodisponibilité, ni le stockage hépatique en fer des animaux ne sont pourtant modifiés. Les résultats de cette étude suggèrent ainsi que les bactéries du tractus intestinal assisteraient les entérocytes dans l'absorption du fer dans l'organisme. Les répercussions du microbiote intestinal sur la biodisponibilité du fer dans l'organisme semblent limitées, mais la distribution de ce dernier dans les différents organes

et les répercussions physiologiques associées nécessitent d'être mieux identifiées, et notamment en condition d'hypoactivité.

## B. Le fer module le microbiote intestinal et son activité

L'écosystème intestinal est en partie dépendant des apports nutritifs de l'hôte. *In-vitro*, une étude montre qu'une déficience en fer altère significativement le microbiote intestinal au point de réduire la production de certains métabolites comme le butyrate (Dostal et al., 2015). A l'inverse, toujours *in-vitro*, une surcharge en fer dans le tractus intestinal altère la flore microbienne saine et entraîne le développement d'une dysbiose (Kortman et al., 2015). Dans les fèces d'enfants kenyans souffrant d'une déficience alimentaire en fer, il est observé une diminution de certaines espèces bactériennes telles que *Roseburia*, *Bacteroides* and *E. Rectal* ainsi qu'une augmentation des *Enterobacteriaceae* et des *Lactobacilli* (Jaeggi et al., 2015). Ces résultats sont corroborés par une étude plus récente qui a mis en évidence une relation inverse entre la concentration fécale en fer et la concentration fécale en *Lactobacillus* chez des enfants affectés par une déficience alimentaire en fer (Kalipatnapu et al., 2017). Sur un modèle de patients hémochromatosiques, Boyer *et al.* (2018) notent récemment un lien entre la saturation en transferrine et la proportion de certaines bactéries (i.e. *Porphyromonas* et *Treponema*). Ces études indiquent que l'apport en fer ainsi que sa biodisponibilité sont des facteurs affectant la composition du microbiote intestinal et son activité. Elles posent des questions autour des intérêts et limites de la supplémentation en fer dans certaines conditions physiologiques ou pathologiques, comme notamment l'hypoactivité.

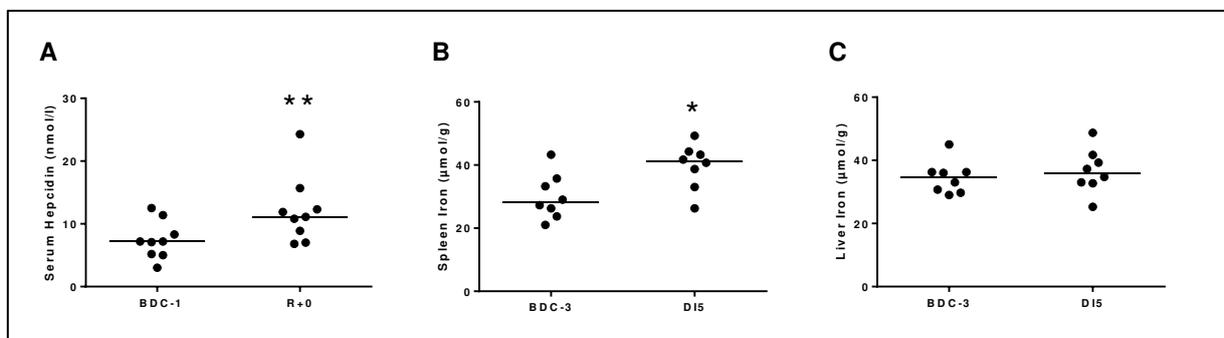
## IV. Perspectives de recherche chez l'homme

### A. Protocoles expérimentaux en cours

Afin de vérifier chez l'homme les différents résultats obtenus sur nos modèles précliniques, nous sommes actuellement impliqués dans une étude clinique conduite par le Centre National d'Etudes Spatiales (CNES). En raison du retard pris dans le démarrage de cette étude indépendamment de notre volonté, nous en présenterons ici seulement les objectifs et quelques résultats préliminaires. Cette étude conduite par le CNES à l'Institut de Médecine de Physiologie Spatiales (MEDES) a consisté à déterminer les effets de 5 jours d'immersion sèche sur le métabolisme du fer et la composition du microbiote intestinal de jeunes hommes en bonne santé. Nous sommes actuellement en train d'effectuer des analyses sanguines pour

établir un bilan martial. Parmi elles, le dosage de l'EPO circulante et des marqueurs d'hémolyse permettront d'étudier respectivement l'érythropoïèse et la dégradation des globules rouges, des phénomènes affectant ou affectés par le métabolisme du fer. Pour l'analyse du microbiote intestinal, le recueil des fèces 15 jours avant l'inclusion, 2 jours avant l'immersion sèche, et durant l'immersion sèche en différents points a été réalisé pour tous les sujets.

Nous avons toutefois d'ores et déjà obtenu des résultats prometteurs concernant la distribution du fer en réponse à ce protocole. En effet, en s'appuyant sur des données IRM pour quantifier les variations de stockage hépatique et splénique en fer selon la méthodologie mise au point par le Pr. Yves Gandon (Gandon et al., 2004), nous retrouvons une augmentation du fer dans la rate après 5 jours d'immersion sèche semblable à celles obtenue chez nos rongeurs exposés à 7 jours de suspension (cf. Figure 1). Cette augmentation est associée à une élévation des niveaux circulants d'hepcidine confirmant le rôle clé joué par cette hormone dans les altérations du métabolisme du fer associées à l'hypoactivité (cf. Figure 1). L'ensemble de ces données confirme donc chez l'homme que l'hypoactivité induit à court terme une redistribution du fer dans l'organisme, tout particulièrement un stockage splénique dans lequel l'hepcidine joue probablement un rôle essentiel.



**Figure n°1 : Impact de 5 jours d'immersion sèche sur la biodisponibilité du fer chez l'Homme.** A) Concentrations sériques en hepcidine. B) Concentration splénique en fer C) Concentrations hépatique en fer. BDC-3 : 3 jours avant l'immersion; BDC-1 : 1 jour avant l'immersion; DI-5 : soir du dernier jour d'immersion R+0 : matin du jour de la fin d'immersion avant remise sur pieds. Significativité testée par le test non-paramétrique Wilcoxon : \*p<0,05; \*\*p<0,01.

Au niveau du microbiote intestinal, les paramètres liés à la composition de ce dernier (i.e. tableaux d'abondances, indices de diversité, répartition des phyla, des familles bactériennes) sont en cours d'analyse. Nous avons conscience d'être ici aussi confrontés à la problématique de la stabilisation du microbiote avant expérimentation. En effet, les sujets sont accueillis dans les locaux du MEDES seulement 4 jours avant leur immersion, ce qui

constitue une période d'acclimatation relativement courte. Elle est toute fois plus longue que celle des astronautes qui, avant d'être envoyés en mission, ne sont placés en quarantaine que très peu de temps (i.e. 48h pour Thomas Pesquet avant de rejoindre l'ISS en 2016). De plus, une fois dans l'espace, ces astronautes se retrouvent subitement dans un environnement clos et confiné dont l'héritage microbien provient d'un mélange des différents passagers qui se sont succédés au cours de l'histoire dans les différents modules spatiaux. Par ailleurs, dans le contexte médical, un patient soudainement hospitalisé se retrouve alité en situation d'hypoactivité avec une nouvelle alimentation imposée par l'établissement hospitalier et ne bénéficie pas d'une acclimatation préalable. Pourtant, dans ces deux contextes, la question de l'adaptation de l'alimentation ou de la supplémentation avec des symbiotiques pour les astronautes ou pour les patients alités peut être légitimement posée afin d'optimiser leur état de santé. Ainsi, si l'objectif de recherche est de développer des stratégies thérapeutiques ou des contre-mesures efficaces et non d'explorer des mécanismes fondamentaux de régulation physiologique, nous pensons que la limite que constitue une acclimatation courte peut au contraire constituer un point positif permettant de proposer un protocole expérimental plus pertinent, c'est-à-dire se situant au plus près de la réalité médicale ou aérospatiale.

## **B. Recommandations pour améliorer la santé des patients et les capacités fonctionnelles des astronautes : réflexions sur des contre-mesures ou thérapies innovantes**

L'alimentation des astronautes est complémentée en fer depuis maintenant plusieurs années dans l'idée de lutter contre l'anémie du vol spatial (Smith et al., 2013). Nos résultats, qui doivent être toutefois confirmés chez l'homme, suggèrent que cette supplémentation apparait finalement inutile. En effet, l'hepcidine bloque l'entrée du fer au niveau de la barrière intestinale en dégradant la ferroportine, ce qui limite directement l'entrée de ce métal dans l'organisme. En cas de réduction de la biodisponibilité en fer, comme cela est le cas en condition d'hypoactivité, supplémenter en fer s'avèrerait inutile car le sujet n'est pas carencé, mais présente visiblement une anomalie dans la distribution de ce métal au sein de son organisme. De plus, l'hepcidine étant augmentée, il est fort probable que le fer apporté dans l'alimentation ne soit que très faiblement absorbé. Nos résultats soulignent donc l'importance de questionner la supplémentation en fer mise en place chez les astronautes durant leurs séjours dans l'espace.

Pour lutter contre cette redistribution du fer dans l'organisme, nos études soulignent qu'il faudrait plutôt cibler l'hepcidine et ses mécanismes de régulation. Nous venons de voir qu'à court terme, l'inflammation apparaît comme responsable de la transcription accrue d'hepcidine via la voie IL-6/STAT3. Limiter l'inflammation, par la prise d'anti-inflammatoires (i.e. ibuprofène, paracétamol) pourrait ainsi constituer une stratégie pertinente pour limiter l'activité de l'hepcidine et conserver une homéostasie ferrique stable. Tout du moins dans les premiers jours d'exposition et à condition que les troubles du métabolisme du fer que nous constatons à court terme ne soient pas des mécanismes adaptatifs nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme en situation d'hypoactivité. En effet, il est possible que la stimulation de la synthèse d'hepcidine soit un mécanisme indispensable à la prise en charge du fer pouvant s'accumuler dans le compartiment sanguin en raison de l'accélération de l'hémolyse des hématies et des réticulocytes (Ginzburg and Glassberg, 2018). D'ailleurs, Xu et al. montrent que l'inhibition de l'hepcidine chez leur souris suspendues par la queue engendre finalement un stockage de fer plus important dans le foie et les os qu'en condition de suspension sans inhibiteur. Ceci a pour conséquence d'affecter de manière plus grave le tissu osseux (Xu et al., 2017). Ainsi, dans cette hypothèse, utiliser des anti-inflammatoires pour empêcher l'activité de l'hepcidine pourrait se révéler finalement inefficace voir délétère en limitant une réaction physiologique protectrice. Des travaux complémentaires apparaissent donc nécessaires pour lever ces interrogations.

La supplémentation en testostérone pourrait également constituer une contre-mesure intéressante pour lutter contre les dérégulations du métabolisme du fer. Cette hormone est en effet connue pour être un répresseur de l'hepcidine (Guo et al., 2013). Ce type de stratégie est d'actualité puisque la NASA a lancé récemment une campagne d'alitement de 70 jours dans laquelle fut évalué l'impact d'une supplémentation en testostérone sur la préservation des capacités fonctionnelles de l'individu (Dillon et al., 2018, 2019). Toutefois, les effets sur le métabolisme du fer n'ont pas été évalués. En plus d'un effet inhibiteur direct sur la synthèse d'hepcidine, la testostérone pourrait agir également sur la synthèse d'hepcidine indirectement via la voie IL-6/STAT3, la supplémentation en testostérone s'accompagnant chez les sujets alités d'une diminution des niveaux circulants d'IL-6 (Dillon et al., 2018).

Enfin, l'exercice physique pourrait constituer une contre-mesure efficace pour moduler le métabolisme du fer et le microbiote intestinal en situation d'hypoactivité.

L'entraînement, notamment en endurance, permet de stimuler l'érythropoïèse (Montero et al., 2017), ce qui favoriserait l'utilisation du fer pour la moelle osseuse rouge dans le contexte de l'hypoactivité. De plus, à l'instar de la testostérone, limiter l'atrophie musculaire par l'exercice physique permettrait peut-être de limiter l'inflammation chronique associée à l'augmentation des taux d'IL-6. Cependant, il est montré que l'exercice physique peut induire différentes adaptations dont certaines pouvant mener à des déficiences en fer (Babić et al., 2001; DeRuisseau et al., 2002; McInnis et al., 1998; Ottomano and Franchini, 2012; Selby and Eichner, 1986). Il a même été montré que les concentrations d'hepcidine augmentent après un effort long et intense comme le marathon (Roecker et al., 2005). Tout ceci souligne que la durée, l'intensité et la fréquence des entraînements proposés aux personnes hypoactives peuvent induire des adaptations bénéfiques ou délétères. Et nous avons vu en début de ce manuscrit combien les études liant microbiote et activité physique donnent des résultats contradictoires et encore trop divers (diversité certainement due au nombre conséquent de modalités d'exercice physique). Ceci nous amène à rester prudents quant l'utilisation immédiate de cette contre-mesure pour prévenir les troubles du métabolisme du fer et du microbiote intestinal en condition d'hypoactivité.

Arriverons-nous à définir « un microbiote santé », « un microbiote de performance », « un microbiote idéal » ? L'étude du microbiote intestinal pour prévenir des troubles pathologiques et/ou physiologiques est un champ de recherche excitant et prometteur. Aujourd'hui, des prouesses sont réalisées sur le modèle animal. Réussir à rendre des souris plus endurantes ou résistantes à l'obésité grâce à l'inoculation de bactéries spécifiques représente des avancées importantes dans l'étude de ce qui nous lie aux micro-organismes nous colonisant (Scheiman et al., 2019; Turnbaugh et al., 2006). Mais très récemment, en 2019, une étude pilote chez l'homme, a tenté la transfection d'un microbiote d'un individu mince en bonne santé sur plusieurs sujets obèses durant 12 semaines consécutives. La flore intestinale des sujets transfectés a bel et bien été modifiée, cependant les scientifiques n'ont observé aucun effet sur le poids et l'IMC des individus (Allegretti et al., 2019). Cet exemple souligne que nos protocoles expérimentaux, notamment chez l'animal, sont peut-être trop sensibles et pas toujours adaptés à une application humaine. La littérature scientifique sur le microbiote intestinal, de plus en plus dense aujourd'hui, doit évidemment être diffusée et vulgarisée tant cet organe est essentiel à la physiologie de notre organisme. Cependant, il est

important d'avoir conscience des limites méthodologiques afin d'éviter la multiplication de stratégies nutritionnelles, pharmaceutiques ou médicales supposées miracles. Des recherches rigoureuses ciblant le microbiote intestinal seront nécessaires chez l'homme pour identifier les probiotiques, prébiotiques ou symbiotiques de demain si l'on souhaite optimiser la santé de la population générale, du patient ou de l'astronaute.



## **BIBLIOGRAPHIE**

Abadi, A., Glover, E.I., Isfort, R.J., Raha, S., Safdar, A., Yasuda, N., Kaczor, J.J., Melov, S., Hubbard, A., Qu, X., et al. (2009). Limb immobilization induces a coordinate down-regulation of mitochondrial and other metabolic pathways in men and women. *PLoS ONE* *4*, e6518.

Adamo, K.B., and Graham, T.E. (1998). Comparison of traditional measurements with macroglycogen and proglycogen analysis of muscle glycogen. *J. Appl. Physiol.* *84*, 908–913.

Adams, G.R., Hather, B.M., and Dudley, G.A. (1994). Effect of short-term unweighting on human skeletal muscle strength and size. *Aviat Space Environ Med* *65*, 1116–1121.

Adams, G.R., Caiozzo, V.J., and Baldwin, K.M. (2003). Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models. *Journal of Applied Physiology* *95*, 2185–2201.

Aisen, P., Enns, C., and Wessling-Resnick, M. (2001). Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *33*, 940–959.

Akima, H., Kubo, K., Imai, M., Kanehisa, H., Suzuki, Y., Gunji, A., and Fukunaga, T. (2001). Inactivity and muscle: effect of resistance training during bed rest on muscle size in the lower limb. *Acta Physiol. Scand.* *172*, 269–278.

Alibegovic, A.C., Højbjerg, L., Sonne, M.P., van Hall, G., Stallknecht, B., Dela, F., and Vaag, A. (2009). Impact of 9 days of bed rest on hepatic and peripheral insulin action, insulin secretion, and whole-body lipolysis in healthy young male offspring of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* *58*, 2749–2756.

Alkner, B.A., and Tesch, P.A. (2004a). Efficacy of a gravity-independent resistance exercise device as a countermeasure to muscle atrophy during 29-day bed rest. *Acta Physiol. Scand.* *181*, 345–357.

Alkner, B.A., and Tesch, P.A. (2004b). Knee extensor and plantar flexor muscle size and function following 90 days of bed rest with or without resistance exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* *93*, 294–305.

Al-Lahham, S.H., Roelofsen, H., Priebe, M., Weening, D., Dijkstra, M., Hoek, A., Rezaee, F., Venema, K., and Vonk, R.J. (2010). Regulation of adipokine production in human adipose tissue by propionic acid. *Eur. J. Clin. Invest.* *40*, 401–407.

Allegretti, J.R., Kassam, Z., Chiang, A.L., Mullish, B.H., Carrellas, M., Hurtado, J., Marchesi, J., McDonald, J.A., Pechlivanis, A., Barker, G.F., et al. (2019). 621 – Fecal Microbiota Transplantation for the Treatment of Obesity: A Randomized, Placebo-Controlled Pilot Trial. *Gastroenterology* *156*, S-129.

Allen, J.M., Berg Miller, M.E., Pence, B.D., Whitlock, K., Nehra, V., Gaskins, H.R., White, B.A., Fryer, J.D., and Woods, J.A. (2015). Voluntary and forced exercise differentially alters the gut microbiome in C57BL/6J mice. *J. Appl. Physiol.* *118*, 1059–1066.

Amador, P., García-Herrera, J., Marca, M.C., de la Osada, J., Acín, S., Navarro, M.A., Salvador, M.T., Lostao, M.P., and Rodríguez-Yoldi, M.J. (2007). Inhibitory effect of TNF-alpha on the intestinal absorption of galactose. *J. Cell. Biochem.* *101*, 99–111.

Andrews, N.C., and Schmidt, P.J. (2007). Iron homeostasis. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 69–85.

Arruda, L.F., Arruda, S.F., Campos, N.A., de Valencia, F.F., and Siqueira, E.M. de A. (2013). Dietary iron concentration may influence aging process by altering oxidative stress in tissues of adult rats. *PLoS ONE* 8, e61058.

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., et al. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174–180.

Asemi, Z., and Esmailzadeh, A. (2013). Effect of daily consumption of probiotic yoghurt on serum levels of calcium, iron and liver enzymes in pregnant women. *Int J Prev Med* 4, 949–955.

ATIH (2019). Chiffres clés 2018 de l'hospitalisation.

Babić, Z., Papa, B., Sikirika-Bosnjaković, M., Prkacin, I., Misigoj-Duraković, M., and Katicić, M. (2001). Occult gastrointestinal bleeding in rugby player. *J Sports Med Phys Fitness* 41, 399–402.

Bäckhed, F., Fraser, C.M., Ringel, Y., Sanders, M.E., Sartor, R.B., Sherman, P.M., Versalovic, J., Young, V., and Finlay, B.B. (2012). Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host Microbe* 12, 611–622.

Baehr, L.M., West, D.W.D., Marshall, A.G., Marcotte, G.R., Baar, K., and Bodine, S.C. (2017). Muscle-specific and age-related changes in protein synthesis and protein degradation in response to hindlimb unloading in rats. *J Appl Physiol* (1985) 122, 1336–1350.

Baker, E., Baker, S.M., and Morgan, E.H. (1998). Characterisation of non-transferrin-bound iron (ferric citrate) uptake by rat hepatocytes in culture. *Biochim. Biophys. Acta* 1380, 21–30.

Baldwin, K.M., Herrick, R.E., and McCue, S.A. (1993). Substrate oxidation capacity in rodent skeletal muscle: effects of exposure to zero gravity. *J. Appl. Physiol.* 75, 2466–2470.

Bangart, J.J., Widrick, J.J., and Fitts, R.H. (1997). Effect of intermittent weight bearing on soleus fiber force-velocity-power and force-pCa relationships. *J. Appl. Physiol.* 82, 1905–1910.

Banzet, S., Sanchez, H., Chapot, R., Bigard, X., Vaulont, S., and Koulmann, N. (2012). Interleukin-6 contributes to hepcidin mRNA increase in response to exercise. *Cytokine* 58, 158–161.

Barton, W., Penney, N.C., Cronin, O., Garcia-Perez, I., Molloy, M.G., Holmes, E., Shanahan, F., Cotter, P.D., and O'Sullivan, O. (2018). The microbiome of professional athletes differs from that of more sedentary subjects in composition and particularly at the functional metabolic level. *Gut* 67, 625–633.

Bayele, H.K., and Srai, S.K.S. (2009). Genetic variation in hepcidin expression and its implications for phenotypic differences in iron metabolism. *Haematologica* 94, 1185–1188.

Belizário, J.E., and Napolitano, M. (2015). Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Front. Microbiol.* 6.

Berg, H.E., Dudley, G.A., Häggmark, T., Ohlsén, H., and Tesch, P.A. (1991). Effects of lower limb unloading on skeletal muscle mass and function in humans. *J. Appl. Physiol.* 70, 1882–1885.

Berg, H.E., Eiken, O., Miklavcic, L., and Mekjavic, I.B. (2007). Hip, thigh and calf muscle atrophy and bone loss after 5-week bedrest inactivity. *Eur. J. Appl. Physiol.* 99, 283–289.

Bergouignan, A., Trudel, G., Simon, C., Chopard, A., Schoeller, D.A., Momken, I., Votruba, S.B., Desage, M., Burdige, G.C., Gauquelin-Koch, G., et al. (2009). Physical Inactivity Differentially Alters Dietary Oleate and Palmitate Trafficking. *Diabetes* 58, 367–376.

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, 1201–1210.

Berry, P., Berry, I., and Manelfe, C. (1993). Magnetic resonance imaging evaluation of lower limb muscles during bed rest--a microgravity simulation model. *Aviat Space Environ Med* 64, 212–218.

Berthon, P., Duguez, S., Favier, F.B., Amirouche, A., Feasson, L., Vico, L., Denis, C., and Freyssenet, D. (2007). Regulation of ubiquitin-proteasome system, caspase enzyme activities, and extracellular proteinases in rat soleus muscle in response to unloading. *Pflugers Arch.* 454, 625–633.

den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., and Bakker, B.M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res* 54, 2325–2340.

Biensø, R.S., Ringholm, S., Kiilerich, K., Aachmann-Andersen, N.-J., Krogh-Madsen, R., Guerra, B., Plomgaard, P., van Hall, G., Trebak, J.T., Saltin, B., et al. (2012). GLUT4 and glycogen synthase are key players in bed rest-induced insulin resistance. *Diabetes* 61, 1090–1099.

Bigard, A.X., Boehm, E., Veksler, V., Mateo, P., Anflous, K., and Ventura-Clapier, R. (1998). Muscle unloading induces slow to fast transitions in myofibrillar but not mitochondrial properties. Relevance to skeletal muscle abnormalities in heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 2391–2401.

Bindels, L.B., and Delzenne, N.M. (2013). Muscle wasting: the gut microbiota as a new therapeutic target? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45, 2186.

Bindels, L.B., Beck, R., Schakman, O., Martin, J.C., De Backer, F., Sohet, F.M., Dewulf, E.M., Pachikian, B.D., Neyrinck, A.M., Thissen, J.-P., et al. (2012). Restoring specific lactobacilli

levels decreases inflammation and muscle atrophy markers in an acute leukemia mouse model. *PLoS ONE* 7, e37971.

Bindels, L.B., Neyrinck, A.M., Salazar, N., Taminiau, B., Druart, C., Muccioli, G.G., François, E., Blecker, C., Richel, A., Daube, G., et al. (2015). Non Digestible Oligosaccharides Modulate the Gut Microbiota to Control the Development of Leukemia and Associated Cachexia in Mice. *PLOS ONE* 10, e0131009.

Blomqvist, C.G., Buckley, J.C., Gaffney, F.A., Lane, L.D., Levine, B.D., and Watenpaugh, D.E. (1994). Mechanisms of post-flight orthostatic intolerance. *J Gravit Physiol* 1, P122-124.

Bodine, S.C., Stitt, T.N., Gonzalez, M., Kline, W.O., Stover, G.L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J.C., Glass, D.J., et al. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat. Cell Biol.* 3, 1014–1019.

de Boer, M.D., Selby, A., Atherton, P., Smith, K., Seynnes, O.R., Maganaris, C.N., Maffulli, N., Movin, T., Narici, M.V., and Rennie, M.J. (2007). The temporal responses of protein synthesis, gene expression and cell signalling in human quadriceps muscle and patellar tendon to disuse. *J. Physiol. (Lond.)* 585, 241–251.

Bongers, K.S., Fox, D.K., Ebert, S.M., Kunkel, S.D., Dyle, M.C., Bullard, S.A., Dierdorff, J.M., and Adams, C.M. (2013). Skeletal muscle denervation causes skeletal muscle atrophy through a pathway that involves both Gadd45a and HDAC4. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305, E907–E915.

Borina, E., Pellegrino, M.A., D'Antona, G., and Bottinelli, R. (2010). Myosin and actin content of human skeletal muscle fibers following 35 days bed rest. *Scand J Med Sci Sports* 20, 65–73.

Bosutti, A., Malaponte, G., Zanetti, M., Castellino, P., Heer, M., Guarnieri, G., and Biolo, G. (2008). Calorie restriction modulates inactivity-induced changes in the inflammatory markers C-reactive protein and pentraxin-3. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 3226–3229.

Boursier, J., Mueller, O., Barret, M., Machado, M., Fizanne, L., Araujo-Perez, F., Guy, C.D., Seed, P.C., Rawls, J.F., David, L.A., et al. (2016). The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology* 63, 764–775.

Boyer, E., Le Gall-David, S., Martin, B., Fong, S.B., Loréal, O., Deugnier, Y., Bonneure-Mallet, M., and Meuric, V. (2018). Increased transferrin saturation is associated with subgingival microbiota dysbiosis and severe periodontitis in genetic haemochromatosis. *Sci Rep* 8.

Brissot, P., and Loréal, O. (2016). Iron metabolism and related genetic diseases: A cleared land, keeping mysteries. *J. Hepatol.* 64, 505–515.

Broadway-Duren, J.B., and Klaassen, H. (2013). Anemias. *Crit Care Nurs Clin North Am* 25, 411–426, v.

Bryndina, I.G., Shalagina, M.N., Ovechkin, S.V., and Ovchinina, N.G. (2014). [Sphingolipids in skeletal muscles of C57B1/6 mice after short-term simulated microgravity]. *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova* 100, 1280–1286.

Buckey, J.C., Lane, L.D., Levine, B.D., Watenpaugh, D.E., Wright, S.J., Moore, W.E., Gaffney, F.A., and Blomqvist, C.G. (1996). Orthostatic intolerance after spaceflight. *J. Appl. Physiol.* 81, 7–18.

Caiozzo, V.J., Baker, M.J., Herrick, R.E., Tao, M., and Baldwin, K.M. (1994). Effect of spaceflight on skeletal muscle: mechanical properties and myosin isoform content of a slow muscle. *J. Appl. Physiol.* 76, 1764–1773.

Caiozzo, V.J., Haddad, F., Baker, M.J., Herrick, R.E., Prietto, N., and Baldwin, K.M. (1996). Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 81, 123–132.

Caiozzo, V.J., Haddad, F., Lee, S., Baker, M., Paloski, W., and Baldwin, K.M. (2009). Artificial gravity as a countermeasure to microgravity: a pilot study examining the effects on knee extensor and plantar flexor muscle groups. *J. Appl. Physiol.* 107, 39–46.

Cani, P.D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., and Burcelin, R. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57, 1470–1481.

Cannavino, J., Brocca, L., Sandri, M., Bottinelli, R., and Pellegrino, M.A. (2014). PGC1- $\alpha$  over-expression prevents metabolic alterations and soleus muscle atrophy in hindlimb unloaded mice. *The Journal of Physiology* 592, 4575–4589.

Capri, M., Morsiani, C., Santoro, A., Moriggi, M., Conte, M., Martucci, M., Bellavista, E., Fabbri, C., Giampieri, E., Albracht, K., et al. (2019). Recovery from 6-month spaceflight at the International Space Station: muscle-related stress into a proinflammatory setting. *FASEB J.* 33, 5168–5180.

Caron, A.Z., Drouin, G., Desrosiers, J., Trenz, F., and Grenier, G. (2009). A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse. *J. Appl. Physiol.* 106, 2049–2059.

Cavey, T., Pierre, N., Nay, K., Allain, C., Ropert, M., Loréal, O., and Derbré, F. (2017). Simulated microgravity decreases circulating iron in rats: role of inflammation-induced hepcidin upregulation. *Exp. Physiol.* 102, 291–298.

Chacon-Cabrera, A., Gea, J., and Barreiro, E. (2017). Short- and Long-Term Hindlimb Immobilization and Reloading: Profile of Epigenetic Events in Gastrocnemius. *J. Cell. Physiol.* 232, 1415–1427.

Chen, Q., and Reimer, R.A. (2009). Dairy protein and leucine alter GLP-1 release and mRNA of genes involved in intestinal lipid metabolism in vitro. *Nutrition* 25, 340–349.

Chen, Y.-M., Wei, L., Chiu, Y.-S., Hsu, Y.-J., Tsai, T.-Y., Wang, M.-F., and Huang, C.-C. (2016). Lactobacillus plantarum TWK10 Supplementation Improves Exercise Performance and Increases Muscle Mass in Mice. *Nutrients* 8.

Choi, J.J., Eum, S.Y., Rampersaud, E., Daunert, S., Abreu, M.T., and Toborek, M. (2013). Exercise Attenuates PCB-Induced Changes in the Mouse Gut Microbiome. *Environ Health Perspect* 121, 725–730.

Clark, B.C., Fernhall, B., and Ploutz-Snyder, L.L. (2006). Adaptations in human neuromuscular function following prolonged unweighting: I. Skeletal muscle contractile properties and applied ischemia efficacy. *J. Appl. Physiol.* 101, 256–263.

Clarke, S.F., Murphy, E.F., O’Sullivan, O., Lucey, A.J., Humphreys, M., Hogan, A., Hayes, P., O’Reilly, M., Jeffery, I.B., Wood-Martin, R., et al. (2014). Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut* 63, 1913–1920.

Clemente, J.C., Ursell, L.K., Parfrey, L.W., and Knight, R. (2012). The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell* 148, 1258–1270.

Coffey, R., and Knutson, M.D. (2017). The plasma membrane metal-ion transporter ZIP14 contributes to nontransferrin-bound iron uptake by human  $\beta$ -cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 312, C169–C175.

Convertino, V.A. (1997). Cardiovascular consequences of bed rest: effect on maximal oxygen uptake. *Med Sci Sports Exerc* 29, 191–196.

Convertino, V.A. (2011). Exercise and Adaptation to Microgravity Environments. In *Comprehensive Physiology*, (American Cancer Society), pp. 815–843.

Convertino, V.A., and Tsiolkovsky, K. (1990). Physiological Adaptations to Weightlessness: Effects on Exercise and Work Performance. *Exercise and Sport Sciences Reviews* 18, 119.

Convertino, V.A., Doerr, D.F., and Stein, S.L. (1989). Changes in size and compliance of the calf after 30 days of simulated microgravity. *J. Appl. Physiol.* 66, 1509–1512.

Cook, M.D., Allen, J.M., Pence, B.D., Wallig, M.A., Gaskins, H.R., White, B.A., and Woods, J.A. (2016). Exercise and gut immune function: evidence of alterations in colon immune cell homeostasis and microbiome characteristics with exercise training. *Immunol. Cell Biol.* 94, 158–163.

Cook, S.B., Brown, K.A., Deruisseau, K., Kanaley, J.A., and Ploutz-Snyder, L.L. (2010). Skeletal muscle adaptations following blood flow-restricted training during 30 days of muscular unloading. *J. Appl. Physiol.* 109, 341–349.

Core, A.B., Canali, S., and Babitt, J.L. (2014). Hemojuvelin and bone morphogenetic protein (BMP) signaling in iron homeostasis. *Front Pharmacol* 5, 104.

Costamagna, D., Costelli, P., Sampaolesi, M., and Penna, F. (2015). Role of Inflammation in Muscle Homeostasis and Myogenesis.

Covinsky, K.E., Palmer, R.M., Fortinsky, R.H., Counsell, S.R., Stewart, A.L., Kresevic, D., Burant, C.J., and Landefeld, C.S. (2003). Loss of independence in activities of daily living in older adults hospitalized with medical illnesses: increased vulnerability with age. *J Am Geriatr Soc* 51, 451–458.

Cros, N., Muller, J., Bouju, S., Piétu, G., Jacquet, C., Léger, J.J., Marini, J.F., and Dechesne, C.A. (1999). Upregulation of M-creatine kinase and glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase: two markers of muscle disuse. *Am. J. Physiol.* 276, R308-316.

Crossland, H., Constantin-Teodosiu, D., Gardiner, S.M., Constantin, D., and Greenhaff, P.L. (2008). A potential role for Akt/FOXO signalling in both protein loss and the impairment of muscle carbohydrate oxidation during sepsis in rodent skeletal muscle. *J Physiol* 586, 5589–5600.

Crossland, H., Skirrow, S., Puthuchery, Z.A., Constantin-Teodosiu, D., and Greenhaff, P.L. (2019). The impact of immobilisation and inflammation on the regulation of muscle mass and insulin resistance: different routes to similar end-points. *J Physiol* 597, 1259–1270.

Cummings, J.H., Pomare, E.W., Branch, W.J., Naylor, C.P., and Macfarlane, G.T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28, 1221–1227.

Dai, Z.-L., Wu, G., and Zhu, W.-Y. (2011). Amino acid metabolism in intestinal bacteria: links between gut ecology and host health. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16, 1768–1786.

D’Antona, G., Pellegrino, M.A., Adami, R., Rossi, R., Carlizzi, C.N., Canepari, M., Saltin, B., and Bottinelli, R. (2003). The effect of ageing and immobilization on structure and function of human skeletal muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 552, 499–511.

D’Antona, G., Ragni, M., Cardile, A., Tedesco, L., Dossena, M., Bruttini, F., Caliaro, F., Corsetti, G., Bottinelli, R., Carruba, M.O., et al. (2010). Branched-chain amino acid supplementation promotes survival and supports cardiac and skeletal muscle mitochondrial biogenesis in middle-aged mice. *Cell Metab.* 12, 362–372.

Daughety, M.M., and DeLoughery, T.G. (2017). Unusual Anemias. *Med. Clin. North Am.* 101, 417–429.

D’Aunno, D.S., Thomason, D.B., and Booth, F.W. (1990). Centrifugal intensity and duration as countermeasures to soleus muscle atrophy. *J. Appl. Physiol.* 69, 1387–1389.

D’Aunno, D.S., Robinson, R.R., Smith, G.S., Thomason, D.B., and Booth, F.W. (1992). Intermittent acceleration as a countermeasure to soleus muscle atrophy. *J. Appl. Physiol.* 72, 428–433.

David, L.A., Maurice, C.F., Carmody, R.N., Gootenberg, D.B., Button, J.E., Wolfe, B.E., Ling, A.V., Devlin, A.S., Varma, Y., Fischbach, M.A., et al. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505, 559–563.

De Santo, N.G., Cirillo, M., Kirsch, K.A., Correale, G., Drummer, C., Frassl, W., Perna, A.F., Di Stazio, E., Bellini, L., and Gunga, H.-C. (2005). Anemia and erythropoietin in space flights. *Semin. Nephrol.* 25, 379–387.

De Silva, A., and Bloom, S.R. (2012). Gut Hormones and Appetite Control: A Focus on PYY and GLP-1 as Therapeutic Targets in Obesity. *Gut Liver* 6, 10–20.

Delzenne, N.M., and Cani, P.D. (2008). [Gut microflora is a key player in host energy homeostasis]. *Med Sci (Paris)* 24, 505–510.

Demangel, R., Treffel, L., Py, G., Brioché, T., Pagano, A.F., Bareille, M., Beck, A., Pessemeesse, L., Candau, R., Gharib, C., et al. (2017). Early structural and functional signature of 3-day human skeletal muscle disuse using the dry immersion model. *J Physiol* 595, 4301–4315.

Derbré, F. (2011). theses.fr – Frédéric Derbré , Etude des voies de signalisation impliquées dans la sarcopénie : rôle du stress oxydant et de l'inactivité physique.

Derbre, F., Ferrando, B., Gomez-Cabrera, M.C., Sanchis-Gomar, F., Martinez-Bello, V.E., Olaso-Gonzalez, G., Diaz, A., Gratas-Delamarche, A., Cerda, M., and Viña, J. (2012). Inhibition of xanthine oxidase by allopurinol prevents skeletal muscle atrophy: role of p38 MAPKinase and E3 ubiquitin ligases. *PLoS ONE* 7, e46668.

DeRuisseau, K.C., Cheuvront, S.N., Haymes, E.M., and Sharp, R.G. (2002). Sweat iron and zinc losses during prolonged exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 12, 428–437.

Deschemin, J.-C., Noordine, M.-L., Remot, A., Willemetz, A., Afif, C., Canonne-Hergaux, F., Langella, P., Karim, Z., Vaulont, S., Thomas, M., et al. (2016). The microbiota shifts the iron sensing of intestinal cells. *FASEB J.* 30, 252–261.

Deschenes, M.R., Holdren, A.N., and McCoy, R.W. (2008). Adaptations to short-term muscle unloading in young and aged men. *Med Sci Sports Exerc* 40, 856–863.

Deschenes, M.R., McCoy, R.W., Holdren, A.N., and Eason, M.K. (2009). Gender influences neuromuscular adaptations to muscle unloading. *Eur. J. Appl. Physiol.* 105, 889–897.

Deschenes, M.R., McCoy, R.W., and Mangis, K.A. (2012). Factors relating to gender specificity of unloading-induced declines in strength. *Muscle Nerve* 46, 210–217.

Deugnier, Y., and Turlin, B. (2007). Pathology of hepatic iron overload. *World J Gastroenterol* 13, 4755–4760.

Dillon, E.L., Sheffield-Moore, M., Durham, W.J., Ploutz-Snyder, L.L., Ryder, J.W., Danesi, C.P., Randolph, K.M., Gilkison, C.R., and Urban, R.J. (2018). Efficacy of Testosterone plus NASA Exercise Countermeasures during Head-Down Bed Rest. *Med Sci Sports Exerc* 50, 1929–1939.

Dillon, E.L., Soman, K.V., Wiktorowicz, J.E., Sur, R., Jupiter, D., Danesi, C.P., Randolph, K.M., Gilkison, C.R., Durham, W.J., Urban, R.J., et al. (2019). Proteomic investigation of human

skeletal muscle before and after 70 days of head down bed rest with or without exercise and testosterone countermeasures. *PLOS ONE* 14, e0217690.

Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2017). Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *The Journal of Physiology* 595, 489–503.

Dine, G., Fumagalli, G., Van Lierde, F., and Genty, V. (2010). Érythropoïèse et métabolisme du fer: interactions et applications biomédicales. *Bio trib. mag.* 34, 22–32.

Dirks, M.L., Wall, B.T., van de Valk, B., Holloway, T.M., Holloway, G.P., Chabowski, A., Goossens, G.H., and van Loon, L.J.C. (2016). One Week of Bed Rest Leads to Substantial Muscle Atrophy and Induces Whole-Body Insulin Resistance in the Absence of Skeletal Muscle Lipid Accumulation. *Diabetes* 65, 2862–2875.

Dodd, K.M., and Tee, A.R. (2012). Leucine and mTORC1: a complex relationship. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302, E1329-1342.

Dodd, S.L., Gagnon, B.J., Senf, S.M., Hain, B.A., and Judge, A.R. (2010). Ros-mediated activation of NF-kappaB and Foxo during muscle disuse. *Muscle Nerve* 41, 110–113.

Donovan, A., Lima, C.A., Pinkus, J.L., Pinkus, G.S., Zon, L.I., Robine, S., and Andrews, N.C. (2005). The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab.* 1, 191–200.

Dorfman, T.A., Levine, B.D., Tillery, T., Peshock, R.M., Hastings, J.L., Schneider, S.M., Macias, B.R., Biolo, G., and Hargens, A.R. (2007). Cardiac atrophy in women following bed rest. *J. Appl. Physiol.* 103, 8–16.

Dostal, A., Lacroix, C., Bircher, L., Pham, V.T., Follador, R., Zimmermann, M.B., and Chassard, C. (2015). Iron Modulates Butyrate Production by a Child Gut Microbiota In Vitro. *MBio* 6, e01453-01415.

Dunn, A.B., Jordan, S., Baker, B.J., and Carlson, N.S. (2017). The Maternal Infant Microbiome: Considerations for Labor and Birth. *MCN Am J Matern Child Nurs* 42, 318–325.

Dupont, E., Cieniewski-Bernard, C., Bastide, B., and Stevens, L. (2011). Electrostimulation during hindlimb unloading modulates PI3K-AKT downstream targets without preventing soleus atrophy and restores slow phenotype through ERK. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300, R408-417.

Dupré-Aucouturier, S., Castells, J., Freyssenet, D., and Desplanches, D. (2015). Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, modulates unloaded-induced skeletal muscle atrophy. *J. Appl. Physiol.* 119, 342–351.

Edgerton, V.R., and Roy, R.R. (1994). Neuromuscular adaptation to actual and simulated weightlessness. *Adv. Space Biol. Med.* 4, 33–67.

Edgerton, V.R., Zhou, M.Y., Ohira, Y., Klitgaard, H., Jiang, B., Bell, G., Harris, B., Saltin, B., Gollnick, P.D., and Roy, R.R. (1995). Human fiber size and enzymatic properties after 5 and 11 days of spaceflight. *J. Appl. Physiol.* 78, 1733–1739.

Elsayed, M.E., Sharif, M.U., and Stack, A.G. (2016). Transferrin Saturation: A Body Iron Biomarker. *Adv Clin Chem* 75, 71–97.

Estaki, M., Pither, J., Baumeister, P., Little, J.P., Gill, S.K., Ghosh, S., Ahmadi-Vand, Z., Marsden, K.R., and Gibson, D.L. (2016). Cardiorespiratory fitness as a predictor of intestinal microbial diversity and distinct metagenomic functions. *Microbiome* 4.

Evans, W.J. (2010). Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity. *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 1123S-1127S.

Everard, A., Lazarevic, V., Derrien, M., Girard, M., Muccioli, G.G., Muccioli, G.M., Neyrinck, A.M., Possemiers, S., Van Holle, A., François, P., et al. (2011). Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes* 60, 2775–2786.

Fang, X., Zhou, X., and Wang, X. (2013). Clinical development of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors for non-Hodgkin lymphoma. *Biomark Res* 1, 30.

Felix, K., Wise, K., Manna, S., Yamauchi, K., Wilson, B.L., Thomas, R.L., Kulkarni, A., Pellis, N.R., and Ramesh, G.T. (2004). Altered cytokine expression in tissues of mice subjected to simulated microgravity. *Mol Cell Biochem* 266, 79–85.

Feng, H.-Z., Chen, X., Malek, M.H., and Jin, J.-P. (2016). Slow recovery of the impaired fatigue resistance in postunloading mouse soleus muscle corresponding to decreased mitochondrial function and a compensatory increase in type I slow fibers. *Am J Physiol Cell Physiol* 310, C27–C40.

Ferrando, A.A., Stuart, C.A., Brunder, D.G., and Hillman, G.R. (1995). Magnetic resonance imaging quantitation of changes in muscle volume during 7 days of strict bed rest. *Aviat Space Environ Med* 66, 976–981.

Ferrando, A.A., Lane, H.W., Stuart, C.A., Davis-Street, J., and Wolfe, R.R. (1996). Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and whole body protein synthesis. *Am. J. Physiol.* 270, E627-633.

Ferretti, G., Berg, H.E., Minetti, A.E., Moia, C., Rampichini, S., and Narici, M.V. (2001). Maximal instantaneous muscular power after prolonged bed rest in humans. *J. Appl. Physiol.* 90, 431–435.

Fischer, C.L., Johnson, P.C., and Berry, C.A. (1967). Red Blood Cell Mass and Plasma Volume Changes in Manned Space Flight. *JAMA* 200, 579–583.

Fitts, R.H., Riley, D.R., and Widrick, J.J. (2000a). Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 89, 823–839.

Fitts, R.H., Desplanches, D., Romatowski, J.G., and Widrick, J.J. (2000b). Spaceflight effects on single skeletal muscle fiber function in the rhesus monkey. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, R1546-1557.

Flint, H.J., Scott, K.P., Duncan, S.H., Louis, P., and Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes* 3, 289–306.

Frazer, D.M., Wilkins, S.J., Becker, E.M., Vulpe, C.D., McKie, A.T., Trinder, D., and Anderson, G.J. (2002). Hepcidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology* 123, 835–844.

Freyssenet, D., Berthon, P., and Denis, C. (1996). Mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to endurance exercises. *Arch. Physiol. Biochem.* 104, 129–141.

Fröhlich, E.E., Farzi, A., Mayerhofer, R., Reichmann, F., Jačan, A., Wagner, B., Zinser, E., Bordag, N., Magnes, C., Fröhlich, E., et al. (2016). Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication. *Brain Behav. Immun.* 56, 140–155.

Frost, R.A., and Lang, C.H. (2008). Regulation of muscle growth by pathogen-associated molecules. *J. Anim. Sci.* 86, E84-93.

Fukae, J., Amasaki, Y., Yamashita, Y., Bohgaki, T., Yasuda, S., Jodo, S., Atsumi, T., and Koike, T. (2005). Butyrate suppresses tumor necrosis factor alpha production by regulating specific messenger RNA degradation mediated through a cis-acting AU-rich element. *Arthritis Rheum.* 52, 2697–2707.

Furet, J.-P., Firmesse, O., Gourmelon, M., Bridonneau, C., Tap, J., Mondot, S., Doré, J., and Corthier, G. (2009). Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68, 351–362.

Gambara, G., Salanova, M., Ciciliot, S., Furlan, S., Gutschmann, M., Schiffl, G., Ungethuem, U., Volpe, P., Gunga, H.-C., and Blottner, D. (2017). Gene Expression Profiling in Slow-Type Calf Soleus Muscle of 30 Days Space-Flown Mice. *PLoS ONE* 12, e0169314.

Gandon, Y., Olivie, D., Guyader, D., Aubé, C., Oberti, F., Sebille, V., and Deugnier, Y. (2004). Non-invasive assessment of hepatic iron stores by MRI. *The Lancet* 363, 357–362.

Ganz, T. (2005). Hepcidin--a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract Res Clin Haematol* 18, 171–182.

Ganz, T. (2011). Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood* 117, 4425–4433.

Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., Ward, R.E., Martin, R.J., Lefevre, M., Cefalu, W.T., and Ye, J. (2009). Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* 58, 1509–1517.

Ginzburg, Y.Z., and Glassberg, J. (2018). Inflammation, Hemolysis, and Erythropoiesis Lead to Competitive Regulation of Hepcidin and Possibly Systemic Iron Status in Sickle Cell Disease. *EBioMedicine* 34, 8–9.

Glover, E.I., Phillips, S.M., Oates, B.R., Tang, J.E., Tarnopolsky, M.A., Selby, A., Smith, K., and Rennie, M.J. (2008). Immobilization induces anabolic resistance in human myofibrillar

protein synthesis with low and high dose amino acid infusion. *J. Physiol. (Lond.)* **586**, 6049–6061.

González, A., Gálvez, N., Martín, J., Reyes, F., Pérez-Victoria, I., and Dominguez-Vera, J.M. (2017). Identification of the key excreted molecule by *Lactobacillus fermentum* related to host iron absorption. *Food Chem* **228**, 374–380.

Gopalakrishnan, R., Genc, K.O., Rice, A.J., Lee, S.M.C., Evans, H.J., Maender, C.C., Ilaslan, H., and Cavanagh, P.R. (2010). Muscle volume, strength, endurance, and exercise loads during 6-month missions in space. *Aviat Space Environ Med* **81**, 91–102.

Goswami, T., and Andrews, N.C. (2006). Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J. Biol. Chem.* **281**, 28494–28498.

Grichko, V.P., Heywood-Cooksey, A., Kidd, K.R., and Fitts, R.H. (2000). Substrate profile in rat soleus muscle fibers after hindlimb unloading and fatigue. *J. Appl. Physiol.* **88**, 473–478.

Grimm, D., Grosse, J., Wehland, M., Mann, V., Reseland, J.E., Sundaresan, A., and Corydon, T.J. (2016). The impact of microgravity on bone in humans. *Bone* **87**, 44–56.

Guillouet, M., Gueret, G., Rannou, F., Giroux-Metges, M.-A., Gioux, M., Arvieux, C.C., and Pennec, J.-P. (2011). Tumor necrosis factor- $\alpha$  downregulates sodium current in skeletal muscle by protein kinase C activation: involvement in critical illness polyneuromyopathy. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **301**, C1057-1063.

Gunga, H.C., Kirsch, K., Baartz, F., Maillet, A., Gharib, C., Nalishiti, W., Rich, I., and Röcker, L. (1996). Erythropoietin under real and simulated microgravity conditions in humans. *J. Appl. Physiol.* **81**, 761–773.

Guo, W., Bachman, E., Li, M., Roy, C.N., Blusztajn, J., Wong, S., Chan, S.Y., Serra, C., Jasuja, R., Travison, T.G., et al. (2013). Testosterone Administration Inhibits Hepcidin Transcription and is Associated with Increased Iron Incorporation into Red Blood Cells. *Aging Cell* **12**, 280–291.

Hackney, K.J., Scott, J.M., Hanson, A.M., English, K.L., Downs, M.E., and Ploutz-Snyder, L.L. (2015). The Astronaut-Athlete: Optimizing Human Performance in Space. *J Strength Cond Res* **29**, 3531–3545.

Haddad, F., Zaldivar, F., Cooper, D.M., and Adams, G.R. (2005). IL-6-induced skeletal muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology*.

Hansen, C.H.F., Nielsen, D.S., Kverka, M., Zakostelska, Z., Klimesova, K., Hudcovic, T., Tlaskalova-Hogenova, H., and Hansen, A.K. (2012). Patterns of Early Gut Colonization Shape Future Immune Responses of the Host. *PLOS ONE* **7**, e34043.

Hanson, A.M., Harrison, B.C., Young, M.H., Stodieck, L.S., and Ferguson, V.L. (2013). Longitudinal characterization of functional, morphologic, and biochemical adaptations in mouse skeletal muscle with hindlimb suspension. *Muscle Nerve* **48**, 393–402.

Hargens, A.R., and Vico, L. (2016). Long-duration bed rest as an analog to microgravity. *J. Appl. Physiol.* *120*, 891–903.

Harris, L.R., Jenkin, M., Jenkin, H., Zacher, J.E., and Dyde, R.T. (2017). The effect of long-term exposure to microgravity on the perception of upright. *Npj Microgravity* *3*, 3.

Hather, B.M., Adams, G.R., Tesch, P.A., and Dudley, G.A. (1992). Skeletal muscle responses to lower limb suspension in humans. *J. Appl. Physiol.* *72*, 1493–1498.

Hauschka, E.O., Roy, R.R., and Edgerton, V.R. (1988). Periodic weight support effects on rat soleus fibers after hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* *65*, 1231–1237.

Henriksen, E.J., Tischler, M.E., Woodman, C.R., Munoz, K.A., Stump, C.S., and Kirby, C.R. (1993). Elevated interstitial fluid volume in soleus muscles unweighted by spaceflight or suspension. *J. Appl. Physiol.* *75*, 1650–1653.

Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., Galy, B., and Camaschella, C. (2010). Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* *142*, 24–38.

Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 425–479.

Hitti, E., Eliat, P.-A., Abgueguen, E., Ropert, M., Leroyer, P., Brissot, P., Gandon, Y., Saint-Jalmes, H., and Loréal, O. (2010). MRI quantification of splenic iron concentration in mouse. *J Magn Reson Imaging* *32*, 639–646.

Ho, N.T., Li, F., Lee-Sarwar, K.A., Tun, H.M., Brown, B.P., Pannaraj, P.S., Bender, J.M., Azad, M.B., Thompson, A.L., Weiss, S.T., et al. (2018). Meta-analysis of effects of exclusive breastfeeding on infant gut microbiota across populations. *Nat Commun* *9*.

Hofer, T., Marzetti, E., Xu, J., Seo, A.Y., Gulec, S., Knutson, M.D., Leeuwenburgh, C., and Dupont-Versteegden, E.E. (2008). Increased iron content and RNA oxidative damage in skeletal muscle with aging and disuse atrophy. *Exp. Gerontol.* *43*, 563–570.

Hoffmann, U., Moore, A.D., Koschate, J., and Drescher, U. (2016).  $\dot{V}O_2$  and HR kinetics before and after International Space Station missions. *Eur. J. Appl. Physiol.* *116*, 503–511.

Holy, X., and Mounier, Y. (1991). Effects of short spaceflights on mechanical characteristics of rat muscles. *Muscle & Nerve* *14*, 70–78.

Hornberger, T.A., Hunter, R.B., Kandarian, S.C., and Esser, K.A. (2001). Regulation of translation factors during hindlimb unloading and denervation of skeletal muscle in rats. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *281*, C179-187.

Houghton, M.J., Kerimi, A., Mouly, V., Tumova, S., and Williamson, G. (2018). Gut microbiome catabolites as novel modulators of muscle cell glucose metabolism. *The FASEB Journal* fj.201801209R.

Hsu, Y.J., Chiu, C.C., Li, Y.P., Huang, W.C., Huang, Y.T., Huang, C.C., and Chuang, H.L. (2015). Effect of intestinal microbiota on exercise performance in mice. *J Strength Cond Res* 29, 552–558.

Huurre, A., Kalliomäki, M., Rautava, S., Rinne, M., Salminen, S., and Isolauri, E. (2008). Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology* 93, 236–240.

Hvid, L., Aagaard, P., Justesen, L., Bayer, M.L., Andersen, J.L., Ørtenblad, N., Kjaer, M., and Suetta, C. (2010). Effects of aging on muscle mechanical function and muscle fiber morphology during short-term immobilization and subsequent retraining. *J. Appl. Physiol.* 109, 1628–1634.

Hwang, I., Park, Y.J., Kim, Y.-R., Kim, Y.N., Ka, S., Lee, H.Y., Seong, J.K., Seok, Y.-J., and Kim, J.B. (2015). Alteration of gut microbiota by vancomycin and bacitracin improves insulin resistance via glucagon-like peptide 1 in diet-induced obesity. *FASEB J.* 29, 2397–2411.

Ikeda, Y., Imao, M., Satoh, A., Watanabe, H., Hamano, H., Horinouchi, Y., Izawa-Ishizawa, Y., Kihira, Y., Miyamoto, L., Ishizawa, K., et al. (2016). Iron-induced skeletal muscle atrophy involves an Akt-forkhead box O3-E3 ubiquitin ligase-dependent pathway. *J Trace Elem Med Biol* 35, 66–76.

Jackman, R.W., and Kandarian, S.C. (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 287, C834–C843.

Jaeggi, T., Kortman, G.A.M., Moretti, D., Chassard, C., Holding, P., Dostal, A., Boekhorst, J., Timmerman, H.M., Swinkels, D.W., Tjalsma, H., et al. (2015). Iron fortification adversely affects the gut microbiome, increases pathogen abundance and induces intestinal inflammation in Kenyan infants. *Gut* 64, 731–742.

Jäger, R., Shields, K.A., Lowery, R.P., Souza, E.O.D., Partl, J.M., Hollmer, C., Purpura, M., and Wilson, J.M. (2016). Probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 reduces exercise-induced muscle damage and increases recovery. *PeerJ* 4, e2276.

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, 12017–12022.

Janssen, A.W.F., and Kersten, S. (2017). Potential mediators linking gut bacteria to metabolic health: a critical view. *The Journal of Physiology* 595, 477–487.

Jansson, E. (1981). Acid soluble and insoluble glycogen in human skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 113, 337–340.

Jelkmann, W. (2016). Erythropoietin. *Front Horm Res* 47, 115–127.

Jeney, V. (2017). Clinical Impact and Cellular Mechanisms of Iron Overload-Associated Bone Loss. *Front Pharmacol* 8, 77.

Jennings, L.A., Auerbach, A.D., Maselli, J., Pekow, P.S., Lindenauer, P.K., and Lee, S.J. (2010). Missed opportunities for osteoporosis treatment in patients hospitalized for hip fracture. *J Am Geriatr Soc* 58, 650–657.

Jensen, T.E., and Richter, E.A. (2012). Regulation of glucose and glycogen metabolism during and after exercise. *J. Physiol. (Lond.)* 590, 1069–1076.

Jiang, B., Ohira, Y., Roy, R.R., Nguyen, Q., Ilyina-Kakueva, E.I., Oganov, V., and Edgerton, V.R. (1992). Adaptation of fibers in fast-twitch muscles of rats to spaceflight and hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* 73, 58S-65S.

Jin, M., Zhang, H., Zhao, K., Xu, C., Shao, D., Huang, Q., Shi, J., and Yang, H. (2018). Responses of Intestinal Mucosal Barrier Functions of Rats to Simulated Weightlessness. *Front Physiol* 9.

Johnson-Wimbley, T.D., and Graham, D.Y. (2011). Diagnosis and management of iron deficiency anemia in the 21st century. *Therap Adv Gastroenterol* 4, 177–184.

Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C., and Chassard, C. (2015). Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutr. Rev.* 73, 426–437.

Jurdana, M., Jenko-Pražnikar, Z., Mohorko, N., Petelin, A., Jakus, T., Šimunič, B., and Pišot, R. (2015). Impact of 14-day bed rest on serum adipokines and low-grade inflammation in younger and older adults. *Age (Dordr)* 37.

Kalipatnapu, S., Kuppaswamy, S., Venugopal, G., Kaliaperumal, V., and Ramadass, B. (2017). Fecal total iron concentration is inversely associated with fecal *Lactobacillus* in preschool children. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 32, 1475–1479.

Kamiya, H., Sasaki, S., Ikeuchi, T., Umemoto, Y., Tatsura, H., Hayashi, Y., Kaneko, S., and Kohri, K. (2003). Effect of simulated microgravity on testosterone and sperm motility in mice. *J. Androl.* 24, 885–890.

Kang, S.S., Jeraldo, P.R., Kurti, A., Miller, M.E.B., Cook, M.D., Whitlock, K., Goldenfeld, N., Woods, J.A., White, B.A., Chia, N., et al. (2014). Diet and exercise orthogonally alter the gut microbiome and reveal independent associations with anxiety and cognition. *Mol Neurodegener* 9, 36.

Kawakami, Y., Muraoka, Y., Kubo, K., Suzuki, Y., and Fukunaga, T. (2000). Changes in muscle size and architecture following 20 days of bed rest. *J Gravit Physiol* 7, 53–59.

Kawakami, Y., Akima, H., Kubo, K., Muraoka, Y., Hasegawa, H., Kouzaki, M., Imai, M., Suzuki, Y., Gunji, A., Kanehisa, H., et al. (2001). Changes in muscle size, architecture, and neural activation after 20 days of bed rest with and without resistance exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 84, 7–12.

Keane, K.N., Cruzat, V.F., Carlessi, R., de Bittencourt, P.I.H., and Newsholme, P. (2015). Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and  $\beta$ -Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev* 2015, 181643.

Kennedy, E.A., King, K.Y., and Baldrige, M.T. (2018). Mouse Microbiota Models: Comparing Germ-Free Mice and Antibiotics Treatment as Tools for Modifying Gut Bacteria. *Front Physiol* 9.

Kenny, H.C., Rudwill, F., Breen, L., Salanova, M., Blottner, D., Heise, T., Heer, M., Blanc, S., and O’Gorman, D.J. (2017). Bed rest and resistive vibration exercise unveil novel links between skeletal muscle mitochondrial function and insulin resistance. *Diabetologia* 60, 1491–1501.

Kim, A., and Nemeth, E. (2015). New insights into iron regulation and erythropoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* 22, 199–205.

Kimball, S.R., and Jefferson, L.S. (2004). Regulation of global and specific mRNA translation by oral administration of branched-chain amino acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 423–427.

Kimura, I., Ozawa, K., Inoue, D., Imamura, T., Kimura, K., Maeda, T., Terasawa, K., Kashihara, D., Hirano, K., Tani, T., et al. (2013). The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nature Communications* 4, 1829.

Kong, W.-N., Gao, G., and Chang, Y.-Z. (2014). Hepcidin and sports anemia. *Cell Biosci* 4, 19.

Korolnek, T., and Hamza, I. (2015). Macrophages and iron trafficking at the birth and death of red cells. *Blood* 125, 2893–2897.

Kortebein, P., Ferrando, A., Lombeida, J., Wolfe, R., and Evans, W.J. (2007). Effect of 10 days of bed rest on skeletal muscle in healthy older adults. *JAMA* 297, 1772–1774.

Kortman, G.A.M., Dutilh, B.E., Maathuis, A.J.H., Engelke, U.F., Boekhorst, J., Keegan, K.P., Nielsen, F.G.G., Betley, J., Weir, J.C., Kingsbury, Z., et al. (2015). Microbial Metabolism Shifts Towards an Adverse Profile with Supplementary Iron in the TIM-2 In vitro Model of the Human Colon. *Front Microbiol* 6, 1481.

Krause, A., Neitz, S., Mägert, H.J., Schulz, A., Forssmann, W.G., Schulz-Knappe, P., and Adermann, K. (2000). LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 480, 147–150.

Kubo, K., Akima, H., Ushiyama, J., Tabata, I., Fukuoka, H., Kanehisa, H., and Fukunaga, T. (2004). Effects of 20 days of bed rest on the viscoelastic properties of tendon structures in lower limb muscles. *Br J Sports Med* 38, 324–330.

Kwon, O.S., Tanner, R.E., Barrows, K.M., Runtzsch, M., Symons, J.D., Jalili, T., Bikman, B.T., McClain, D.A., O’Connell, R.M., and Drummond, M.J. (2015a). MyD88 regulates physical

inactivity-induced skeletal muscle inflammation, ceramide biosynthesis signaling, and glucose intolerance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **309**, E11-21.

Kwon, O.S., Tanner, R.E., Barrows, K.M., Runtsch, M., Symons, J.D., Jalili, T., Bikman, B.T., McClain, D.A., O'Connell, R.M., and Drummond, M.J. (2015b). MyD88 regulates physical inactivity-induced skeletal muscle inflammation, ceramide biosynthesis signaling, and glucose intolerance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **309**, E11-21.

Kwon, O.S., Nelson, D.S., Barrows, K.M., O'Connell, R.M., and Drummond, M.J. (2016). Intramyocellular ceramides and skeletal muscle mitochondrial respiration are partially regulated by Toll-like receptor 4 during hindlimb unloading. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **311**, R879–R887.

Lahiri, S., Kim, H., Garcia-Perez, I., Reza, M.M., Martin, K.A., Kundu, P., Cox, L.M., Selkrig, J., Posma, J.M., Zhang, H., et al. (2019). The gut microbiota influences skeletal muscle mass and function in mice. *Sci Transl Med* **11**.

Lalani, R., Bhasin, S., Byhower, F., Tarnuzzer, R., Grant, M., Shen, R., Asa, S., Ezzat, S., and Gonzalez-Cadavid, N.F. (2000). Myostatin and insulin-like growth factor-I and -II expression in the muscle of rats exposed to the microgravity environment of the NeuroLab space shuttle flight. *J. Endocrinol.* **167**, 417–428.

Lambert, J.E., Myslicki, J.P., Bomhof, M.R., Belke, D.D., Shearer, J., and Reimer, R.A. (2015). Exercise training modifies gut microbiota in normal and diabetic mice. *Appl Physiol Nutr Metab* **40**, 749–752.

Lamoureux, E.V., Grandy, S.A., and Langille, M.G.I. (2017). Moderate Exercise Has Limited but Distinguishable Effects on the Mouse Microbiome. *MSystems* **2**.

Lang, C.H., Molina, P.E., Yousef, K.A., Tepper, P.G., and Abumrad, N.N. (1993). Role of IL-1 alpha in central nervous system immunomodulation of glucoregulation. *Brain Res.* **624**, 53–60.

Lang, C.H., Frost, R.A., and Vary, T.C. (2007). Regulation of muscle protein synthesis during sepsis and inflammation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **293**, E453-459.

Lang, S.M., Kazi, A.A., Hong-Brown, L., and Lang, C.H. (2012). Delayed Recovery of Skeletal Muscle Mass following Hindlimb Immobilization in mTOR Heterozygous Mice. *PLOS ONE* **7**, e38910.

Lawen, A. (2015). Is erythroferrone finally the long sought-after systemic erythroid regulator of iron? *World J Biol Chem* **6**, 78–82.

Lawen, A., and Lane, D.J.R. (2013). Mammalian iron homeostasis in health and disease: uptake, storage, transport, and molecular mechanisms of action. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 2473–2507.

Lawler, J.M., Song, W., and Demaree, S.R. (2003). Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 9–16.

Lawler, J.M., Kunst, M., Hord, J.M., Lee, Y., Joshi, K., Botchlett, R.E., Ramirez, A., and Martinez, D.A. (2014). EUK-134 ameliorates nNOS $\mu$  translocation and skeletal muscle fiber atrophy during short-term mechanical unloading. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 306, R470-482.

Leach, C.S. (1992). Biochemical and hematologic changes after short-term space flight. *Microgravity Q* 2, 69–75.

Leach, C.S., Johnson, P.C., and Cintrón, N.M. (1988). The endocrine system in space flight. *Acta Astronaut* 17, 161–166.

LeBlanc, A., Rowe, R., Schneider, V., Evans, H., and Hedrick, T. (1995). Regional muscle loss after short duration spaceflight. *Aviat Space Environ Med* 66, 1151–1154.

LeBlanc, A., Lin, C., Shackelford, L., Sinitsyn, V., Evans, H., Belichenko, O., Schenkman, B., Kozlovskaya, I., Oganov, V., Bakulin, A., et al. (2000). Muscle volume, MRI relaxation times (T<sub>2</sub>), and body composition after spaceflight. *J. Appl. Physiol.* 89, 2158–2164.

LeBlanc, A.D., Schneider, V.S., Evans, H.J., Pientok, C., Rowe, R., and Spector, E. (1992). Regional changes in muscle mass following 17 weeks of bed rest. *J. Appl. Physiol.* 73, 2172–2178.

Lee, D.Y., Wetzsteon, R.J., Zemel, B.S., Shults, J., Organ, J.M., Foster, B.J., Herskovitz, R.M., Foerster, D.L., and Leonard, M.B. (2015). Muscle Torque Relative to Cross-Sectional Area and the Functional Muscle-Bone Unit in Children and Adolescents with Chronic Disease. *J Bone Miner Res* 30, 575–583.

Levine, B.D., Lane, L.D., Watenpaugh, D.E., Gaffney, F.A., Buckey, J.C., and Blomqvist, C.G. (1996). Maximal exercise performance after adaptation to microgravity. *J. Appl. Physiol.* 81, 686–694.

Levy, L.B., and Welch, A.A. (2015). Implications of skeletal muscle loss for public health nutrition messages: a brief report. *Proc Nutr Soc* 74, 426–429.

Ley, R.E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P.J., Ramey, R.R., Bircher, J.S., Schlegel, M.L., Tucker, T.A., Schrenzel, M.D., Knight, R., et al. (2008). Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 320, 1647–1651.

Li, P., Shi, J., Zhang, P., Wang, K., Li, J., Liu, H., Zhou, Y., Xu, X., Hao, J., Sun, X., et al. (2015). Simulated microgravity disrupts intestinal homeostasis and increases colitis susceptibility. *The FASEB Journal* 29, 3263–3273.

Liang, C., Benson, M., and DeRuisseau, K.C. (2017). Effects of Moderate Iron Loading on Skeletal Muscle Function and Oxidative Injury. *The FASEB Journal* 31, 1021.21-1021.21.

Liang, C., Mickey, M.C., Receno, C.N., Atalay, M., and DeRuisseau, K.C. (2019). Functional and biochemical responses of skeletal muscle following a moderate degree of systemic iron loading in mice. *Journal of Applied Physiology* 126, 799–809.

Lichten, L.A., and Cousins, R.J. (2009). Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annu. Rev. Nutr.* 29, 153–176.

Lin, X., Hanson, E., Betik, A.C., Brennan-Speranza, T.C., Hayes, A., and Levinger, I. (2016). Hindlimb Immobilization, But Not Castration, Induces Reduction of Undercarboxylated Osteocalcin Associated With Muscle Atrophy in Rats. *J. Bone Miner. Res.* 31, 1967–1978.

Linninge, C., Ahrné, S., and Molin, G. (2015). Pre-treatment with antibiotics and *Escherichia coli* to equalize the gut microbiota in conventional mice. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107, 149–156.

Lipman, R.L., Ulvedal, F., Schnure, J.J., Bradley, E.M., and Lecocq, F.R. (1970). Glucoregulatory hormone response to 2-deoxy-d-glucose infusion in normal subjects at bedrest. *Metab. Clin. Exp.* 19, 980–987.

Lipman, R.L., Raskin, P., Love, T., Triebwasser, J., Lecocq, F.R., and Schnure, J.J. (1972). Glucose intolerance during decreased physical activity in man. *Diabetes* 21, 101–107.

Liu, H., and Thompson, L.V. (2019). Skeletal muscle denervation investigations: selecting an experimental control wisely. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 316, C456–C461.

Liu, Q., Sun, L., Tan, Y., Wang, G., Lin, X., and Cai, L. (2009). Role of iron deficiency and overload in the pathogenesis of diabetes and diabetic complications. *Curr. Med. Chem.* 16, 113–129.

Liuzzi, J.P., Lichten, L.A., Rivera, S., Blanchard, R.K., Aydemir, T.B., Knutson, M.D., Ganz, T., and Cousins, R.J. (2005). Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 6843–6848.

Loréal, O., Camberlein, É., Fatih, N., and Brissot, P. (2008). Combattre l'hémochromatose, la piste de l'hepcidine. </data/revues/00380814/00520716/55/>.

Loréal, O., Cavey, T., Bardou-Jacquet, E., Guggenbuhl, P., Ropert, M., and Brissot, P. (2014). Iron, hepcidin, and the metal connection. *Front Pharmacol* 5.

Lovejoy, J.C., Smith, S.R., Zachwieja, J.J., Bray, G.A., Windhauser, M.M., Wickersham, P.J., Veldhuis, J.D., Tulley, R., and de la Bretonne, J.A. (1999). Low-dose T(3) improves the bed rest model of simulated weightlessness in men and women. *Am. J. Physiol.* 277, E370–379.

Lundberg, R., Toft, M.F., August, B., Hansen, A.K., and Hansen, C.H.F. (2016). Antibiotic-treated versus germ-free rodents for microbiota transplantation studies. *Gut Microbes* 7, 68–74.

Macfarlane, G.T., Cummings, J.H., Macfarlane, S., and Gibson, G.R. (1989). Influence of retention time on degradation of pancreatic enzymes by human colonic bacteria grown in a 3-stage continuous culture system. *J. Appl. Bacteriol.* 67, 520–527.

Maillard, F., Vazeille, E., Sauvanet, P., Sirvent, P., Combaret, L., Sourdrille, A., Chavanelle, V., Bonnet, R., Otero, Y.F., Delcros, G., et al. (2019). High intensity interval training promotes total and visceral fat mass loss in obese Zucker rats without modulating gut microbiota. *PLoS ONE* 14, e0214660.

Marques, O., da Silva, B.M., Porto, G., and Lopes, C. (2014). Iron homeostasis in breast cancer. *Cancer Lett.* 347, 1–14.

Martin, T.P., Edgerton, V.R., and Grindeland, R.E. (1988). Influence of spaceflight on rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 65, 2318–2325.

Maslowski, K.M., Vieira, A.T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., Schilter, H.C., Rolph, M.S., Mackay, F., Artis, D., et al. (2009). Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 461, 1282–1286.

MATSUMOTO, M., INOUE, R., TSUKAHARA, T., USHIDA, K., CHIJI, H., MATSUBARA, N., and HARA, H. (2008). Voluntary Running Exercise Alters Microbiota Composition and Increases n-Butyrate Concentration in the Rat Cecum. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72, 572–576.

Maughan, R.J., Burke, L.M., Dvorak, J., Larson-Meyer, D.E., Peeling, P., Phillips, S.M., Rawson, E.S., Walsh, N.P., Garthe, I., Geyer, H., et al. (2018). IOC consensus statement: dietary supplements and the high-performance athlete. *Br J Sports Med* 52, 439–455.

McCall, G.E., Goulet, C., Grindeland, R.E., Hodgson, J.A., Bigbee, A.J., and Edgerton, V.R. (1997). Bed rest suppresses bioassayable growth hormone release in response to muscle activity. *J. Appl. Physiol.* 83, 2086–2090.

McClung, J.M., Judge, A.R., Talbert, E.E., and Powers, S.K. (2009). Calpain-1 is required for hydrogen peroxide-induced myotube atrophy. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 296, C363–371.

McDonald, K.S., Delp, M.D., and Fitts, R.H. (1992). Fatigability and blood flow in the rat gastrocnemius-plantaris-soleus after hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* 73, 1135–1140.

McFadzean, R. (2014). Exercise can help modulate human gut microbiota. Undergraduate Honors Theses.

McGregor, R.A., Cameron-Smith, D., and Poppitt, S.D. (2014). It is not just muscle mass: a review of muscle quality, composition and metabolism during ageing as determinants of muscle function and mobility in later life. *Longev Healthspan* 3.

McInnis, M.D., Newhouse, I.J., von Duvillard, S.P., and Thayer, R. (1998). The effect of exercise intensity on hematuria in healthy male runners. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 79, 99–105.

Membrez, M., Blancher, F., Jaquet, M., Bibiloni, R., Cani, P.D., Burcelin, R.G., Cortesy, I., Macé, K., and Chou, C.J. (2008). Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *FASEB J.* 22, 2416–2426.

Metter, E.J., Lynch, N., Conwit, R., Lindle, R., Tobin, J., and Hurley, B. (1999). Muscle quality and age: cross-sectional and longitudinal comparisons. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 54, B207-218.

Mikines, K.J., Richter, E.A., Dela, F., and Galbo, H. (1991). Seven days of bed rest decrease insulin action on glucose uptake in leg and whole body. *J. Appl. Physiol.* 70, 1245–1254.

Miljkovic, N., Lim, J.-Y., Miljkovic, I., and Frontera, W.R. (2015). Aging of Skeletal Muscle Fibers. *Ann Rehabil Med* 39, 155–162.

Miller, M.E., Cronkite, E.P., and Garcia, J.F. (1982). Plasma levels of immunoreactive erythropoietin after acute blood loss in man. *Br. J. Haematol.* 52, 545–549.

Miokovic, T., Armbrrecht, G., Felsenberg, D., and Belavý, D.L. (2012). Heterogeneous atrophy occurs within individual lower limb muscles during 60 days of bed rest. *J. Appl. Physiol.* 113, 1545–1559.

Mitch, W.E., and Goldberg, A.L. (1996). Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N. Engl. J. Med.* 335, 1897–1905.

Miu, B., Martin, T.P., Roy, R.R., Oganov, V., Ilyina-Kakueva, E., Marini, J.F., Leger, J.J., Bodine-Fowler, S.C., and Edgerton, V.R. (1990). Metabolic and morphologic properties of single muscle fibers in the rat after spaceflight, Cosmos 1887. *FASEB J.* 4, 64–72.

Miyazaki, M., Noguchi, M., and Takemasa, T. (2008). Intermittent Reloading Attenuates Muscle Atrophy through Modulating Akt/mTOR Pathway. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 40, 848–855.

Monda, V., Villano, I., Messina, A., Valenzano, A., Esposito, T., Moscatelli, F., Viggiano, A., Cibelli, G., Chieffi, S., Monda, M., et al. (2017). Exercise Modifies the Gut Microbiota with Positive Health Effects. *Oxid Med Cell Longev* 2017.

Mondon, C.E., Rodnick, K.J., Dolkas, C.B., Azhar, S., and Reaven, G.M. (1992). Alterations in glucose and protein metabolism in animals subjected to simulated microgravity. *Adv Space Res* 12, 169–177.

Montero, D., Breenfeldt-Andersen, A., Oberholzer, L., Haider, T., Goetze, J.P., Meinild-Lundby, A.-K., and Lundby, C. (2017). Erythropoiesis with endurance training: dynamics and mechanisms. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 312, R894–R902.

Montgomery, L.D. (1993). Body volume changes during simulated microgravity. II: Comparison of horizontal and head-down bed rest. *Aviat Space Environ Med* 64, 899–904.

Montonye, D.R., Ericsson, A.C., Busi, S.B., Lutz, C., Wardwell, K., and Franklin, C.L. (2018). Acclimation and Institutionalization of the Mouse Microbiota Following Transportation. *Front Microbiol* 9.

Moore, A.D., Downs, M.E., Lee, S.M.C., Feiveson, A.H., Knudsen, P., and Ploutz-Snyder, L. (2014). Peak exercise oxygen uptake during and following long-duration spaceflight. *J. Appl. Physiol.* 117, 231–238.

Morey-Holton, E.R., and Globus, R.K. (2002). Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J. Appl. Physiol.* 92, 1367–1377.

Morey-Holton, E., Globus, R.K., Kaplansky, A., and Durnova, G. (2005). The hindlimb unloading rat model: literature overview, technique update and comparison with space flight data. *Adv. Space Biol. Med.* 10, 7–40.

Morgan, J.L.L., Zwart, S.R., Heer, M., Ploutz-Snyder, R., Ericson, K., and Smith, S.M. (2012). Bone metabolism and nutritional status during 30-day head-down-tilt bed rest. *J. Appl. Physiol.* 113, 1519–1529.

Morikawa, D., Nojiri, H., Saita, Y., Kobayashi, K., Watanabe, K., Ozawa, Y., Koike, M., Asou, Y., Takaku, T., Kaneko, K., et al. (2013). Cytoplasmic reactive oxygen species and SOD1 regulate bone mass during mechanical unloading. *J. Bone Miner. Res.* 28, 2368–2380.

Muñoz, M., Villar, I., and García-Erce, J.A. (2009). An update on iron physiology. *World J Gastroenterol* 15, 4617–4626.

Mutin-Carnino, M., Carnino, A., Roffino, S., and Chopard, A. (2014). Effect of muscle unloading, reloading and exercise on inflammation during a head-down bed rest. *Int J Sports Med* 35, 28–34.

Nairz, M., Theurl, I., Swirski, F.K., and Weiss, G. (2017). “Pumping iron”—how macrophages handle iron at the systemic, microenvironmental, and cellular levels. *Pflugers Arch* 469, 397–418.

Nakao, R., Yamamoto, S., Yasumoto, Y., Kadota, K., and Oishi, K. (2015). Impact of denervation-induced muscle atrophy on housekeeping gene expression in mice. *Muscle Nerve* 51, 276–281.

Narici, M.V., and de Boer, M.D. (2011). Disuse of the musculo-skeletal system in space and on earth. *Eur. J. Appl. Physiol.* 111, 403–420.

Navasolava, N.M., Custaud, M.-A., Tomilovskaya, E.S., Larina, I.M., Mano, T., Gauquelin-Koch, G., Gharib, C., and Kozlovskaya, I.B. (2011). Long-term dry immersion: review and prospects. *Eur. J. Appl. Physiol.* 111, 1235–1260.

Nefedov, Y.G., Shilov, V.M., Konstantinova, I.V., and Zaloguyev, S.N. (1971). Microbiological and immunological aspects of extended manned space flights. *Life Sci Space Res* 9, 11–16.

Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C., Grandchamp, B., Kahn, A., and Vulont, S. (2001). Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 8780–8785.

Nicolino, S., Panetto, A., Raimondo, S., Gambarotta, G., Guzzini, M., Fornaro, M., Battiston, B., Tos, P., Geuna, S., and Perroteau, I. (2009). Denervation and reinnervation of adult skeletal muscle modulate mRNA expression of neuregulin-1 and ErbB receptors. *Microsurgery* *29*, 464–472.

Ohgami, R.S., Campagna, D.R., McDonald, A., and Fleming, M.D. (2006). The Steap proteins are metalloreductases. *Blood* *108*, 1388–1394.

Ohira, Y., Jiang, B., Roy, R.R., Oganov, V., Ilyina-Kakueva, E., Marini, J.F., and Edgerton, V.R. (1992). Rat soleus muscle fiber responses to 14 days of spaceflight and hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* *73*, 515-575.

Okamoto, T., Morino, K., Ugi, S., Nakagawa, F., Lemecha, M., Ida, S., Ohashi, N., Sato, D., Fujita, Y., and Maegawa, H. (2019). Microbiome potentiates endurance exercise through intestinal acetate production. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* *316*, E956–E966.

Ørtenblad, N., Westerblad, H., and Nielsen, J. (2013). Muscle glycogen stores and fatigue. *J Physiol* *591*, 4405–4413.

Ottomano, C., and Franchini, M. (2012). Sports anaemia: facts or fiction? *Blood Transfus* *10*, 252–254.

Paddon-Jones, D., Sheffield-Moore, M., Zhang, X.-J., Volpi, E., Wolf, S.E., Aarsland, A., Ferrando, A.A., and Wolfe, R.R. (2004). Amino acid ingestion improves muscle protein synthesis in the young and elderly. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *286*, E321-328.

Pagano, A.F., Briocche, T., Arc-Chagnaud, C., Demangel, R., Chopard, A., and Py, G. (2018). Short-term disuse promotes fatty acid infiltration into skeletal muscle. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* *9*, 335–347.

Palaferrri Schieber, A.M., Lee, Y.M., Chang, M.W., Leblanc, M., Collins, B., Downes, M., Evans, R.M., and Ayres, J.S. (2015). Disease tolerance mediated by commensal *E. coli* via inflammasome and IGF-1 signaling. *Science* *350*, 558–563.

de Palma, L., Marinelli, M., Pavan, M., and Orazi, A. (2008). Ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx in human skeletal muscle atrophy. *Joint Bone Spine* *75*, 53–57.

Pavy-Le Traon, A., Heer, M., Narici, M.V., Rittweger, J., and Vernikos, J. (2007). From space to Earth: advances in human physiology from 20 years of bed rest studies (1986-2006). *Eur. J. Appl. Physiol.* *101*, 143–194.

Pedersen, H.K., Gudmundsdottir, V., Nielsen, H.B., Hyotylainen, T., Nielsen, T., Jensen, B.A.H., Forslund, K., Hildebrand, F., Prifti, E., Falony, G., et al. (2016). Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature* 535, 376–381.

Penders, J., Thijs, C., van den Brandt, P.A., Kummeling, I., Snijders, B., Stelma, F., Adams, H., van Ree, R., and Stobberingh, E.E. (2007). Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut* 56, 661–667.

Peng, L., He, Z., Chen, W., Holzman, I.R., and Lin, J. (2007). Effects of butyrate on intestinal barrier function in a Caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. *Pediatr. Res.* 61, 37–41.

Perhonen, M.A., Franco, F., Lane, L.D., Buckey, J.C., Blomqvist, C.G., Zerwekh, J.E., Peshock, R.M., Weatherall, P.T., and Levine, B.D. (2001). Cardiac atrophy after bed rest and spaceflight. *J. Appl. Physiol.* 91, 645–653.

Pierre, N., Appriou, Z., Gratas-Delamarche, A., and Derbré, F. (2016). From physical inactivity to immobilization: Dissecting the role of oxidative stress in skeletal muscle insulin resistance and atrophy. *Free Radical Biology and Medicine* 197–207.

Pietsch, J., Bauer, J., Egli, M., Infanger, M., Wise, P., Ulbrich, C., and Grimm, D. (2011). The effects of weightlessness on the human organism and mammalian cells. *Curr. Mol. Med.* 11, 350–364.

Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P., and Loréal, O. (2001). A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J. Biol. Chem.* 276, 7811–7819.

Ploquin, C., Chabi, B., Fouret, G., Vernus, B., Feillet-Coudray, C., Coudray, C., Bonniou, A., and Ramonatxo, C. (2012). Lack of myostatin alters intermyofibrillar mitochondria activity, unbalances redox status, and impairs tolerance to chronic repetitive contractions in muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302, E1000-1008.

Ploutz-Snyder, L.L., Tesch, P.A., Crittenden, D.J., and Dudley, G.A. (1995). Effect of unweighting on skeletal muscle use during exercise. *J. Appl. Physiol.* 79, 168–175.

Pols, T.W.H., Auwerx, J., and Schoonjans, K. (2010). Targeting the TGR5-GLP-1 pathway to combat type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 34, 270–273.

Pottle, D., and Gosselin, L.E. (2000). Impact of mechanical load on functional recovery after muscle reloading. *Med Sci Sports Exerc* 32, 2012–2017.

Powers, S.K., Kavazis, A.N., and DeRuisseau, K.C. (2005). Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288, R337-344.

Powers, S.K., Wiggs, M.P., Duarte, J.A., Zergeroglu, A.M., and Demirel, H.A. (2012). Mitochondrial signaling contributes to disuse muscle atrophy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *303*, E31-39.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* *464*, 59–65.

Queipo-Ortuño, M.I., Seoane, L.M., Murri, M., Pardo, M., Gomez-Zumaquero, J.M., Cardona, F., Casanueva, F., and Tinahones, F.J. (2013). Gut Microbiota Composition in Male Rat Models under Different Nutritional Status and Physical Activity and Its Association with Serum Leptin and Ghrelin Levels. *PLOS ONE* *8*, e65465.

Rabot, S., Membrez, M., Bruneau, A., Gérard, P., Harach, T., Moser, M., Raymond, F., Mansourian, R., and Chou, C.J. (2010). Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *FASEB J.* *24*, 4948–4959.

Ramey, G., Deschemin, J.-C., Durel, B., Canonne-Hergaux, F., Nicolas, G., and Vaulont, S. (2010). Hepcidin targets ferroportin for degradation in hepatocytes. *Haematologica* *95*, 501–504.

Reardon, T.F., and Allen, D.G. (2009). Iron injections in mice increase skeletal muscle iron content, induce oxidative stress and reduce exercise performance. *Exp. Physiol.* *94*, 720–730.

Reikvam, D.H., Erofeev, A., Sandvik, A., Grcic, V., Jahnsen, F.L., Gaustad, P., McCoy, K.D., Macpherson, A.J., Meza-Zepeda, L.A., and Johansen, F.-E. (2011). Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. *PLoS ONE* *6*, e17996.

Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Cheng, J., Duncan, A.E., Kau, A.L., Griffin, N.W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J.R., et al. (2013). Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* *341*, 1241214.

Riley, D.A., Bain, J.L.W., Romatowski, J.G., and Fitts, R.H. (2005). Skeletal muscle fiber atrophy: altered thin filament density changes slow fiber force and shortening velocity. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *288*, C360-365.

Risso, A., Ciana, A., Achilli, C., Antonutto, G., and Minetti, G. (2014). Neocytolysis: none, one or many? A reappraisal and future perspectives. *Front Physiol* *5*.

Ritchie, L.E., Taddeo, S.S., Weeks, B.R., Lima, F., Bloomfield, S.A., Azcarate-Peril, M.A., Zwart, S.R., Smith, S.M., and Turner, N.D. (2015). Space Environmental Factor Impacts upon Murine Colon Microbiota and Mucosal Homeostasis. *PLoS One* *10*.

Röder, P.V., Geillinger, K.E., Zietek, T.S., Thorens, B., Koepsell, H., and Daniel, H. (2014). The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing. *PLoS ONE* *9*, e89977.

Rodriguez, J., Vernus, B., Chelh, I., Cassar-Malek, I., Gabillard, J.C., Hadj Sassi, A., Seiliez, I., Picard, B., and Bonniieu, A. (2014). Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* *71*, 4361–4371.

Roecker, L., Meier-Buttermilch, R., Brechtel, L., Nemeth, E., and Ganz, T. (2005). Iron-regulatory protein hepcidin is increased in female athletes after a marathon. *Eur. J. Appl. Physiol.* *95*, 569–571.

Rudrappa, S.S., Wilkinson, D.J., Greenhaff, P.L., Smith, K., Idris, I., and Atherton, P.J. (2016). Human Skeletal Muscle Disuse Atrophy: Effects on Muscle Protein Synthesis, Breakdown, and Insulin Resistance—A Qualitative Review. *Front Physiol* *7*.

Rudwill, F., O’Gorman, D., Lefai, E., Chery, I., Zahariev, A., Normand, S., Pagano, A.F., Chopard, A., Damiot, A., Laurens, C., et al. (2018). Metabolic Inflexibility Is an Early Marker of Bed-Rest–Induced Glucose Intolerance Even When Fat Mass Is Stable. *J Clin Endocrinol Metab* *103*, 1910–1920.

Ryan, B.J., Goodrich, J.A., Schmidt, W.F., Stothard, E.R., Wright, K.P., and Byrnes, W.C. (2016). Haemoglobin mass alterations in healthy humans following four-day head-down tilt bed rest. *Exp. Physiol.* *101*, 628–640.

Saha, P., Yeoh, B.S., Singh, R., Chandrasekar, B., Vemula, P.K., Haribabu, B., Vijay-Kumar, M., and Jala, V.R. (2016). Gut Microbiota Conversion of Dietary Ellagic Acid into Bioactive Phytochemical Urolithin A Inhibits Heme Peroxidases. *PLoS ONE* *11*, e0156811.

Salaun, E., Lefevre-Orfila, L., Cavey, T., Martin, B., Turlin, B., Ropert, M., Loreal, O., and Derbré, F. (2016). Myriocin prevents muscle ceramide accumulation but not muscle fiber atrophy during short-term mechanical unloading. *J. Appl. Physiol.* *120*, 178–187.

Salazar, J.J., Michele, D.E., and Brooks, S.V. (2010). Inhibition of calpain prevents muscle weakness and disruption of sarcomere structure during hindlimb suspension. *J Appl Physiol* (1985) *108*, 120–127.

Samuel, B.S., Shaito, A., Motoike, T., Rey, F.E., Backhed, F., Manchester, J.K., Hammer, R.E., Williams, S.C., Crowley, J., Yanagisawa, M., et al. (2008). Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 16767–16772.

Sandonà, D., Desaphy, J.-F., Camerino, G.M., Bianchini, E., Ciciliot, S., Danieli-Betto, D., Dobrowolny, G., Furlan, S., Germinario, E., Goto, K., et al. (2012). Adaptation of mouse skeletal muscle to long-term microgravity in the MDS mission. *PLoS ONE* *7*, e33232.

Scheiman, J., Lubner, J.M., Chavkin, T.A., MacDonald, T., Tung, A., Pham, L.-D., Wibowo, M.C., Wurth, R.C., Punthambaker, S., Tierney, B.T., et al. (2019). Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. *Nat. Med.* *25*, 1104–1109.

Schiaffino, S., Sandri, M., and Murgia, M. (2007). Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity. *Physiology (Bethesda)* *22*, 269–278.

Schneider, S.M., Lee, S.M.C., Feiveson, A.H., Watenpugh, D.E., Macias, B.R., and Hargens, A.R. (2016). Treadmill exercise within lower body negative pressure protects leg lean tissue mass and extensor strength and endurance during bed rest. *Physiol Rep* 4.

Schuijt, T.J., Lankelma, J.M., Scicluna, B.P., de Sousa e Melo, F., Roelofs, J.J.T.H., de Boer, J.D., Hoogendijk, A.J., de Beer, R., de Vos, A., Belzer, C., et al. (2016). The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia. *Gut* 65, 575–583.

Schulze, K., Gallagher, P., and Trappe, S. (2002). Resistance training preserves skeletal muscle function during unloading in humans. *Med Sci Sports Exerc* 34, 303–313.

Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M., and Finlay, B.B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* 90, 859–904.

Selby, G.B., and Eichner, E.R. (1986). Endurance swimming, intravascular hemolysis, anemia, and iron depletion. New perspective on athlete's anemia. *Am. J. Med.* 81, 791–794.

Shackelford, L.C., LeBlanc, A.D., Driscoll, T.B., Evans, H.J., Rianon, N.J., Smith, S.M., Spector, E., Feedback, D.L., and Lai, D. (2004). Resistance exercise as a countermeasure to disuse-induced bone loss. *J. Appl. Physiol.* 97, 119–129.

Shenkman, B.S., Kozlovskaya, I.B., Nemirovskaya, T.L., and Tcheglova, I.A. (1997). Human muscle atrophy in supportlessness: effects of short-term exposure to dry immersion. *J Gravit Physiol* 4, P137-138.

Shenoy, N., Vallumsetla, N., Rachmilewitz, E., Verma, A., and Ginzburg, Y. (2014). Impact of iron overload and potential benefit from iron chelation in low-risk myelodysplastic syndrome. *Blood* 124, 873–881.

Shi, J., Wang, Y., He, J., Li, P., Jin, R., Wang, K., Xu, X., Hao, J., Zhang, Y., Liu, H., et al. (2017). Intestinal microbiota contributes to colonic epithelial changes in simulated microgravity mouse model. *FASEB J.* 31, 3695–3709.

Shimkus, K.L., Jefferson, L.S., Gordon, B.S., and Kimball, S.R. (2018). Repressors of mTORC1 act to blunt the anabolic response to feeding in the soleus muscle of a cast-immobilized mouse hindlimb. *Physiol Rep* 6, e13891.

Shul'zhenko, E.B., Kozlova, V.G., Kurdin, K.A., Iarov, A.S., and Plokhova, V.G. (1983). [The antigravity suit, chamberless type, as a means of increasing orthostatic tolerance after water immersion hypokinesia and acceleration]. *Kosm Biol Aviakosm Med* 17, 30–33.

Siu, P.M., Wang, Y., and Alway, S.E. (2009). Apoptotic signaling induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidative stress in differentiated C2C12 myotubes. *Life Sci.* 84, 468–481.

Skrypnik, K., and Suliburska, J. (2018). Association between the gut microbiota and mineral metabolism. *J. Sci. Food Agric.* 98, 2449–2460.

Smith, J.K. (2018). IL-6 and the dysregulation of immune, bone, muscle, and metabolic homeostasis during spaceflight. *Npj Microgravity* 4, 1–8.

Smith, S.M. (2002). Red blood cell and iron metabolism during space flight. *Nutrition* 18, 864–866.

Smith, S.M., Zwart, S.R., Block, G., Rice, B.L., and Davis-Street, J.E. (2005). The nutritional status of astronauts is altered after long-term space flight aboard the International Space Station. *J. Nutr.* 135, 437–443.

Smith, S.M., Heer, M., Wang, Z., Huntoon, C.L., and Zwart, S.R. (2012). Long-Duration Space Flight and Bed Rest Effects on Testosterone and Other Steroids. *J Clin Endocrinol Metab* 97, 270–278.

Smith, S.M., Rice, B.L., Dlouhy, H., and Zwart, S.R. (2013). Assessment of Nutritional Intake During Space Flight and Space Flight Analogs. *Procedia Food Science* 2, 27–34.

Smorawiński, J., Kaciuba-Uściłko, H., Nazar, K., Kubala, P., Kamińska, E., Ziemba, A.W., Adrian, J., and Greenleaf, J.E. (2000). Effects of three-day bed rest on metabolic, hormonal and circulatory responses to an oral glucose load in endurance or strength trained athletes and untrained subjects. *J. Physiol. Pharmacol.* 51, 279–289.

Soares, M.P., and Hamza, I. (2016). Macrophages and iron metabolism. *Immunity* 44, 492–504.

Sonnenburg, E.D., and Sonnenburg, J.L. (2014). Starving our microbial self: the deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. *Cell Metab.* 20, 779–786.

Staron, R.S. (1997). Human skeletal muscle fiber types: delineation, development, and distribution. *Can J Appl Physiol* 22, 307–327.

Stegemann, J., Hoffmann, U., Erdmann, R., and Essfeld, D. (1997). Exercise capacity during and after spaceflight. *Aviat Space Environ Med* 68, 812–817.

Stein, T.P., and Blanc, S. (2011). Does protein supplementation prevent muscle disuse atrophy and loss of strength? *Crit Rev Food Sci Nutr* 51, 828–834.

Strunk, B.C., Ginsburg, P.B., and Banker, M.I. (2006). The effect of population aging on future hospital demand. *Health Aff (Millwood)* 25, w141-149.

Stuart, C.A., Shangraw, R.E., Prince, M.J., Peters, E.J., and Wolfe, R.R. (1988). Bed-rest-induced insulin resistance occurs primarily in muscle. *Metab. Clin. Exp.* 37, 802–806.

Suetta, C., Hvid, L.G., Justesen, L., Christensen, U., Neergaard, K., Simonsen, L., Ortenblad, N., Magnusson, S.P., Kjaer, M., and Aagaard, P. (2009). Effects of aging on human skeletal muscle after immobilization and retraining. *J. Appl. Physiol.* 107, 1172–1180.

Sun, Y., Shuang, F., Chen, D.M., and Zhou, R.B. (2013). Treatment of hydrogen molecule abates oxidative stress and alleviates bone loss induced by modeled microgravity in rats. *Osteoporos Int* 24, 969–978.

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* (1985) *107*, 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*, 909–914.

Tako, E., Glahn, R.P., Knez, M., and Stangoulis, J.C. (2014). The effect of wheat prebiotics on the gut bacterial population and iron status of iron deficient broiler chickens. *Nutr J* *13*, 58.

Talbert, E.E., Smuder, A.J., Min, K., Kwon, O.S., Szeto, H.H., and Powers, S.K. (2013). Immobilization-induced activation of key proteolytic systems in skeletal muscles is prevented by a mitochondria-targeted antioxidant. *J. Appl. Physiol.* *115*, 529–538.

Tanno, T., Porayette, P., Sripichai, O., Noh, S.-J., Byrnes, C., Bhupatiraju, A., Lee, Y.T., Goodnough, J.B., Harandi, O., Ganz, T., et al. (2009). Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood* *114*, 181–186.

Tavassoli, M. (1982). Anemia of spaceflight. *Blood* *60*, 1059–1067.

Taylor, P., Martinez-Torres, C., Leets, I., Garcã, N., and Layrisse, A.-C.A. (2014). Relationships among Iron Absorption, Percent SCAotnucreantitornatioonf PilnasHmuamTanras1nsferrin a[nd Serum Ferritin. 6.

Thomason, D.B., Herrick, R.E., and Baldwin, K.M. (1987). Activity influences on soleus muscle myosin during rodent hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* *63*, 138–144.

Tilg, H., and Moschen, A.R. (2008). Inflammatory Mechanisms in the Regulation of Insulin Resistance. *Mol Med* *14*, 222–231.

Tomilovskaya, E., Shigueva, T., Sayenko, D., Rukavishnikov, I., and Kozlovskaya, I. (2019). Dry Immersion as a Ground-Based Model of Microgravity Physiological Effects. *Front. Physiol.* *10*.

Trappe, S., Trappe, T., Gallagher, P., Harber, M., Alkner, B., and Tesch, P. (2004). Human single muscle fibre function with 84 day bed-rest and resistance exercise. *J Physiol* *557*, 501–513.

Trappe, S., Costill, D., Gallagher, P., Creer, A., Peters, J.R., Evans, H., Riley, D.A., and Fitts, R.H. (2009). Exercise in space: human skeletal muscle after 6 months aboard the International Space Station. *J. Appl. Physiol.* *106*, 1159–1168.

Trappe, T., Trappe, S., Lee, G., Widrick, J., Fitts, R., and Costill, D. (2006). Cardiorespiratory responses to physical work during and following 17 days of bed rest and spaceflight. *J. Appl. Physiol.* *100*, 951–957.

Tremblay, F., Krebs, M., Dombrowski, L., Brehm, A., Bernroider, E., Roth, E., Nowotny, P., Waldhäusl, W., Marette, A., and Roden, M. (2005). Overactivation of S6 kinase 1 as a cause of human insulin resistance during increased amino acid availability. *Diabetes* *54*, 2674–2684.

Trudel, G., Uthoff, H.K., and Laneville, O. (2017). Hemolysis during and after 21 days of head-down-tilt bed rest. *Physiol Rep* *5*.

Tsay, J., Yang, Z., Ross, F.P., Cunningham-Rundles, S., Lin, H., Coleman, R., Mayer-Kuckuk, P., Doty, S.B., Grady, R.W., Giardina, P.J., et al. (2010). Bone loss caused by iron overload in a murine model: importance of oxidative stress. *Blood* *116*, 2582–2589.

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* *444*, 1027–1031.

Turnbaugh, P.J., Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Knight, R., and Gordon, J.I. (2009). The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med* *1*, 6ra14.

Varian, B.J., Goureshetti, S., Poutahidis, T., Lakritz, J.R., Levkovich, T., Kwok, C., Teliouis, K., Ibrahim, Y.M., Mirabal, S., and Erdman, S.E. (2016). Beneficial bacteria inhibit cachexia. *Oncotarget* *7*, 11803–11816.

Vary, T.C., and Lynch, C.J. (2007). Nutrient signaling components controlling protein synthesis in striated muscle. *J. Nutr.* *137*, 1835–1843.

Viatte, L. (2006). Mode d'action de l'hépcidine, nouvelle hormone du métabolisme du fer, et son implication dans l'hémochromatose. Université Paris-Diderot - Paris VII.

Viaud, S., Saccheri, F., Mignot, G., Yamazaki, T., Daillère, R., Hannani, D., Enot, D.P., Pfirschke, C., Engblom, C., Pittet, M.J., et al. (2013). The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science* *342*, 971–976.

Walker, A.W., Ince, J., Duncan, S.H., Webster, L.M., Holtrop, G., Ze, X., Brown, D., Stares, M.D., Scott, P., Bergerat, A., et al. (2011). Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J* *5*, 220–230.

Wall, B.T., Snijders, T., Senden, J.M.G., Ottenbros, C.L.P., Gijsen, A.P., Verdijk, L.B., and van Loon, L.J.C. (2013). Disuse impairs the muscle protein synthetic response to protein ingestion in healthy men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *98*, 4872–4881.

Wang, H., Li, H., Jiang, X., Shi, W., Shen, Z., and Li, M. (2014). Hepsidin is directly regulated by insulin and plays an important role in iron overload in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* *63*, 1506–1518.

Wang, P., Tian, H., Zhang, J., Qian, J., Li, L., Shi, L., and Zhao, Y. (2019). Spaceflight/microgravity inhibits the proliferation of hematopoietic stem cells by decreasing Kit-Ras/cAMP-CREB pathway networks as evidenced by RNA-Seq assays. *The FASEB Journal* *33*, 5903–5913.

Weiss, G. (2009). Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 682–693.

White, J.P. (2016). Control of Skeletal Muscle Cell Growth and Size Through Adhesion GPCRs. *Handb Exp Pharmacol* 234, 299–308.

Whitt, D.D., and Demoss, R.D. (1975). Effect of microflora on the free amino acid distribution in various regions of the mouse gastrointestinal tract. *Appl Microbiol* 30, 609–615.

Widrick, J.J., Knuth, S.T., Norenberg, K.M., Romatowski, J.G., Bain, J.L.W., Riley, D.A., Karhanek, M., Trappe, S.W., Trappe, T.A., Costill, D.L., et al. (1999). Effect of a 17 day spaceflight on contractile properties of human soleus muscle fibres. *J Physiol* 516, 915–930.

Widrick, J.J., Maddalozzo, G.F., Hu, H., Herron, J.C., Iwaniec, U.T., and Turner, R.T. (2008). Detrimental effects of reloading recovery on force, shortening velocity, and power of soleus muscles from hindlimb-unloaded rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295, R1585-1592.

Wlazlo, N., van Greevenbroek, M.M.J., Ferreira, I., Jansen, E.H.J.M., Feskens, E.J.M., van der Kallen, C.J.H., Schalkwijk, C.G., Bravenboer, B., and Stehouwer, C.D.A. (2015). Iron metabolism is prospectively associated with insulin resistance and glucose intolerance over a 7-year follow-up period: the CODAM study. *Acta Diabetol* 52, 337–348.

Wrighting, D.M., and Andrews, N.C. (2006). Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* 108, 3204–3209.

Wu, G.D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S.A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W.A., Knight, R., et al. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334, 105–108.

Wu, P., Chawla, A., Spinner, R.J., Yu, C., Yaszemski, M.J., Windebank, A.J., and Wang, H. (2014). Key changes in denervated muscles and their impact on regeneration and reinnervation. *Neural Regen Res* 9, 1796–1809.

Xiao, F., Huang, Z., Li, H., Yu, J., Wang, C., Chen, S., Meng, Q., Cheng, Y., Gao, X., Li, J., et al. (2011). Leucine deprivation increases hepatic insulin sensitivity via GCN2/mTOR/S6K1 and AMPK pathways. *Diabetes* 60, 746–756.

Xin, M., Yang, Y., Zhang, D., Wang, J., Chen, S., and Zhou, D. (2015). Attenuation of hind-limb suspension-induced bone loss by curcumin is associated with reduced oxidative stress and increased vitamin D receptor expression. *Osteoporos Int* 26, 2665–2676.

Xu, Z., Sun, W., Li, Y., Ling, S., Zhao, C., Zhong, G., Zhao, D., Song, J., Song, H., Li, J., et al. (2017). The regulation of iron metabolism by hepcidin contributes to unloading-induced bone loss. *Bone* 94, 152–161.

Yamashita, H., Maruta, H., Jozuka, M., Kimura, R., Iwabuchi, H., Yamato, M., Saito, T., Fujisawa, K., Takahashi, Y., Kimoto, M., et al. (2009). Effects of acetate on lipid metabolism in

muscles and adipose tissues of type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 570–576.

Yamashita-Goto, K., Okuyama, R., Honda, M., Kawasaki, K., Fujita, K., Yamada, T., Nonaka, I., Ohira, Y., and Yoshioka, T. (2001). Maximal and submaximal forces of slow fibers in human soleus after bed rest. *Journal of Applied Physiology* **91**, 417–424.

Yan, H., Diao, H., Xiao, Y., Li, W., Yu, B., He, J., Yu, J., Zheng, P., Mao, X., Luo, Y., et al. (2016). Gut microbiota can transfer fiber characteristics and lipid metabolic profiles of skeletal muscle from pigs to germ-free mice. *Sci Rep* **6**, 31786.

Yang, J., Yang, Z., Li, W., Xue, Y., Xu, H., Li, J., and Shang, P. (2017). Glucocorticoid: A potential role in microgravity-induced bone loss. *Acta Astronautica* **140**, 206–212.

Yang, J., Zhang, G., Dong, D., and Shang, P. (2018a). Effects of Iron Overload and Oxidative Damage on the Musculoskeletal System in the Space Environment: Data from Spaceflights and Ground-Based Simulation Models. *Int J Mol Sci* **19**.

Yang, Y., Qu, C., Liang, S., Wang, G., Han, H., Chen, N., Wang, X., Luo, Z., Zhong, C., Chen, Y., et al. (2018b). Estrogen inhibits the overgrowth of *Escherichia coli* in the rat intestine under simulated microgravity. *Mol Med Rep* **17**, 2313–2320.

Yasuda, N., Glover, E.I., Phillips, S.M., Isfort, R.J., and Tarnopolsky, M.A. (2005). Sex-based differences in skeletal muscle function and morphology with short-term limb immobilization. *J. Appl. Physiol.* **99**, 1085–1092.

Yatsunenکو, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**, 222–227.

Yoshimura, K., Asato, H., Jejurikar, S.S., Cederna, P.S., Urbančhek, M.G., and Kuzon, W.M. (2002). The effect of two episodes of denervation and reinnervation on skeletal muscle contractile function. *Plast. Reconstr. Surg.* **109**, 212–219.

Yu, Z.-B., Gao, F., Feng, H.-Z., and Jin, J.-P. (2007). Differential regulation of myofilament protein isoforms underlying the contractility changes in skeletal muscle unloading. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C1192–C1203.

Zange, J., Müller, K., Schuber, M., Wackerhage, H., Hoffmann, U., Günther, R.W., Adam, G., Neuerburg, J.M., Sinitsyn, V.E., Bacharev, A.O., et al. (1997). Changes in calf muscle performance, energy metabolism, and muscle volume caused by long-term stay on space station MIR. *Int J Sports Med* **18 Suppl 4**, S308-309.

Zarrinpar, A., Chaix, A., Xu, Z.Z., Chang, M.W., Marotz, C.A., Saghatelian, A., Knight, R., and Panda, S. (2018). Antibiotic-induced microbiome depletion alters metabolic homeostasis by affecting gut signaling and colonic metabolism. *Nat Commun* **9**, 2872.

Zhang, A.-S. (2010). Control of Systemic Iron Homeostasis by the Hemojuvelin-Hepcidin Axis. *Adv Nutr* **1**, 38–45.

Zhang, L.F. (2001). Vascular adaptation to microgravity: what have we learned? *J. Appl. Physiol.* *91*, 2415–2430.

Zhang, G., Jin, B., and Li, Y.-P. (2011). C/EBP $\beta$  mediates tumour-induced ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx upregulation and muscle wasting. *EMBO J* *30*, 4323–4335.

Zhao, N., Zhang, A.-S., and Enns, C.A. (2013). Iron regulation by hepcidin. *J Clin Invest* *123*, 2337–2343.

Zhong, G.-H., Ling, S.-K., and Li, Y.-X. (2016). [Mechanism of cardiac atrophy under weightlessness/simulated weightlessness]. *Sheng Li Xue Bao* *68*, 194–200.

Zhou, Y., Ni, H., Li, M., Sanzari, J.K., Diffenderfer, E.S., Lin, L., Kennedy, A.R., and Weissman, D. (2012). Effect of Solar Particle Event Radiation and Hindlimb Suspension on Gastrointestinal Tract Bacterial Translocation and Immune Activation. *PLoS One* *7*.

Zwart, S.R., Crawford, G.E., Gillman, P.L., Kala, G., Rodgers, A.S., Rogers, A., Inniss, A.M., Rice, B.L., Ericson, K., Coburn, S., et al. (2009). Effects of 21 days of bed rest, with or without artificial gravity, on nutritional status of humans. *J Appl Physiol* (1985) *107*, 54–62.

Zwart, S.R., Morgan, J.L.L., and Smith, S.M. (2013). Iron status and its relations with oxidative damage and bone loss during long-duration space flight on the International Space Station. *Am. J. Clin. Nutr.* *98*, 217–223.

# **ANNEXES**

## **I. Fiches méthodologiques**

## Fiche méthodologique n°1

### *Protocole de suspension par la queue et de rechargement intermittent*

**Principe :** La suspension par la queue est le modèle expérimental que nous avons utilisé pour mettre les animaux en condition d'hypoactivité. Ce protocole a été initialement mis au point par la NASA pour mimer les effets de l'impesanteur au niveau des membres inférieurs et postérieurs. Les cages ont été fabriquées artisanalement avec les dimensions et les détails techniques fournis dans la publication de Morey-Holton (2002).



### **Mise en place de la suspension des animaux :**

#### **Etape 1 : Fixation de l'anneau à la queue de l'animal**

1. Préparation de bandes adhésives d'environ 1.5 cm de large pour 20 cm de longueur de manière à couvrir les 2/3 de la queue de l'animal.
2. Placer l'animal dans un tube de plexiglas spécialement conçu pour l'immobiliser (il faut éviter d'anesthésier l'animal pour qu'il puisse s'adapter au mieux à la suspension).
3. Appliquer un antiseptique sur la queue du rongeur pour la nettoyer et éliminer les peaux mortes.
4. Coller la bande d'adhésif préparée préalablement à environ 1 à 2 cm de la base de la queue. Enrouler la queue avec l'adhésif jusqu'à la moitié de sa longueur (environ 5 tours). Ne pas serrer trop fort afin de maintenir la circulation sanguine.
5. Passer l'anneau en acier dans l'adhésif puis enrouler de nouveau la queue avec le reste d'adhésif en repassant par-dessus l'adhésif préalablement collé. L'anneau est fixé alors à la queue de l'animal.

#### **Populations :**

Rats et souris

#### **Matériels :**

- Tubes de Plexiglas
- Ruban adhésif de type Elastoplast
- Anneaux d'acier inoxydable (2 cm de diamètre)
- Emerillons 
- Câble électrique
- Alcool 90°
- Cages de suspension
- Bac de litière sous la cage

#### **Etape 2 : Accrochage de l'animal dans la cage**

1. Placer l'émerillon dans l'anneau en acier. Cette pièce permet à l'animal de pivoter à 360° sur ses pattes avant afin de pouvoir boire et s'alimenter.
2. Passer un câble électrique dans l'émerillon puis l'accrocher au système de suspension. Le dispositif de suspension se situe dans la partie supérieure de la cage entre 2 barres parallèles sur lesquelles il peut glisser de part et d'autres de la cage. Ce système est fabriqué de manière à ce que le dispositif de suspension glisse avec le moins de résistance possible. L'animal peut ainsi tirer dessus sans effort et se déplacer aisément sur les pattes avant.
3. La longueur du câble électrique est ajustée pour que le corps du rongeur soit suspendu à un angle de 30° avec le sol, de manière à ce qu'il ne puisse toucher le sol avec ses pattes arrière. Cette longueur est réajustée quotidiennement durant l'expérimentation si nécessaire.

### **Rechargement intermittent**

1. Décrocher le câble électrique de l'anneau et laisser le rat en autonomie dans sa cage en surveillant à ce qu'il ne ronge pas sa bande adhésive ou sa queue.
2. Une fois le temps écoulé (ex : 1H/jour), raccrocher le système et vérifier que les pattes arrière du rongeur ne sont pas en contact avec le sol.

*Fiche méthodologique adaptée de la thèse de Frédéric Derbré (Derbré, 2011)*

## Fiche méthodologique n°2

### **Protocole de déplétion du microbiote intestinal par un traitement antibiotique à large spectre et réensemencement naturel du microbiote**

**Principe :** Le traitement antibiotique à large spectre permet de détruire les bactéries intestinales en quelques jours chez la souris (Viaud et al., 2013). Ainsi, il est possible d'étudier l'effet de cette absence de flore sans avoir à utiliser des modèles de souris axéniques dont les conditions d'élevage sont contraignantes. L'arrêt du traitement permet aux bactéries de se réimplanter progressivement, mais dans notre étude, nous avons accéléré cette recolonisation en ajoutant les fèces de congénères sans traitement (groupe CTL) dans les cages des souris dites « réensemencées » (groupe NAT).

#### **1. Protocole de déplétion du microbiote intestinal par un traitement antibiotique**

##### **Préparation de la solution d'antibiotique à large spectre**

###### ➤ **Etape 1 : Préparation des solutions stocks**

Filtrée sur 0.22 µm, les solutions stocks sont préparées dans de l'eau distillée :  
Ampicilline: 100 mg/ml Streptomycine: 100 mg/ml Colistine: 80 mg/ml Vancomycine: 45 mg/ml  
Les solutions sont ensuite aliquotées et congelées à -20°C.

###### ➤ **Etape 2 : Préparation des biberons d'antibiotique à large spectre**

Les aliquots des solutions stocks sont décongelés et la solution d'antibiotique à large spectre est préparée en fonction du nombre de biberons à remplir selon les dilutions du tableau ci-dessous. Il faut compter 50 ml de solution d'antibiotique à large spectre par biberon. L'eau utilisée pour la préparation des biberons est de l'eau du robinet provenant de l'animalerie stérilisée sur filtre 0.22 µm.

	Concentrations stock	Concentrations finales souhaitées	Volume de stock à mettre dans 50 ml d'eau pour 1 biberon)	Exemple pour 72 biberons (3600 ml)
<b>Ampicilline</b>	100 mg/ml	1 mg/ml	500 µl	36 ml
<b>Streptomycine</b>	100 mg/ml	5 mg/ml	2.5 ml	180 ml
<b>Colistine</b>	80 mg/ml	1 mg/ml	612 µl	45 ml
<b>Vancomycine</b>	45 mg/ml	45 µg/ml	50 µl	3.6 ml

##### **Administration de l'antibiotique**

50 ml de la solution finale d'antibiotique à large spectre sont donnés dans des biberons propres. Un biberon est disponible par cage. Afin de limiter le transfert de germes entre animaux, les souris de l'expérimentation doivent être disposées individuellement dans des cages à couvercle filtrant. Les biberons d'antibiotique et la cage doivent être changés toutes les semaines.

#### **2. Protocole de réensemencement naturel du microbiote**

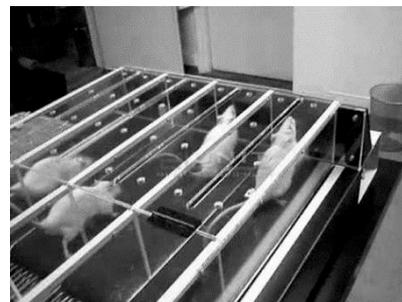
Le biberon d'antibiotique à large spectre est remplacé par un biberon contenant de l'eau du robinet de l'animalerie identique au contrôle CTL. Pour accélérer le processus, un apport de litière usagée provenant des différents individus du groupe contrôle est placé dans la cage des souris à réensemencer.

## Fiche méthodologique n°3

### Tests de course sur tapis roulant

#### **Principe :**

2 tests ont été effectués afin d'évaluer les performances de course. Le test de vitesse maximale aérobie (VMA) évalue la vitesse à laquelle la puissance aérobie de l'animal sera maximale. Cette dernière est dépendante de la capacité maximale de consommation d'oxygène ( $\dot{V}O_{2max}$ ). L'autre test est un test de temps limite jusqu'à épuisement. Ce test évalue le temps au terme duquel l'animal s'épuise sur un effort constant et témoigne de la capacité maximale aérobie de l'animal. Ce paramètre est notamment dépendant des réserves énergétiques de l'animal ainsi que de son état de fatigue. Les animaux sont stimulés par l'expérimentateur. L'usage de légères décharges via une grille électrifiée à l'arrière du tapis peut également être utilisé.



**Populations :** Souris

**Matériel :** Tapis, Columbus Instruments, OH 43204 U.S.A)

#### **Habituation :**

Les souris doivent préalablement être habituées à courir sur un tapis. Ainsi, une semaine avant les premiers tests, chaque souris a effectué deux sessions d'habituation espacées d'au moins 48h :

- La première session se compose de 5 min à 8 m/min, 5 min à 10 m/min et 10 min à 12 m/min
- La seconde session se compose de 2 min à 10m/min, 2 min à 12m/min, 10 min à 14m/min, 5 min à 16m/min et 2 min à 18m/min.

#### **Tests :**

Afin de limiter les effets de la fatigue sur la performance, les tests sont effectués au moins 48h après l'habituation. Les tests VMA et les tests de temps limites sont également espacés d'au moins 48h.

#### **Déroulement du test VMA**

1. Échauffement : 2 min à 10 m/min
2. Incrémentation de 2 m/min toutes les minutes jusqu'à épuisement
3. Le test s'arrête lorsque la souris tombe trois fois de suite ou reste 3 secondes sur la grille électrique. L'expérimentateur note alors la vitesse atteinte qui constitue la VMA

#### **Déroulement du test de temps limite :**

1. Échauffement : 2 min à 12 m/min puis 3 min à 15 m/min
2. 30 min à 17 m/min
3. Incrémentation de 1 m/min toutes les 5 minutes
4. Le test s'arrête lorsque la souris tombe trois fois de suite ou reste 3 secondes sur la grille électrique. L'expérimentateur note alors le temps et la distance d'effort de la souris qui constituent des indicateurs d'endurance.

## Fiche méthodologique n°4

### Tests de contractilité *ex-vivo*

**Principe :** Le test de propriété contractile *ex-vivo* mesure la force et l'endurance (fatigue-index) d'un muscle isolé sous différentes impulsions électriques (Ploquin et al., 2012).

#### Préparation des solutions :

Solution mère (10X) du tampon de Krebs (pour 500 ml à conserver à 4°C)

- NaCl 119 mM (MM 58,4) : 34,748 g
  - KCl 5 Mm (MM 74,5) : 1,8636 g
  - CaCl<sub>2</sub> 1,25 mM (MM 147,2) : 0,92 g
  - MgSO<sub>4</sub> 1 mM (MM 120,4) : 0,602 g
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM (MM 136,09) : 0,681 g
- } Ajuster 500 ml H<sub>2</sub>O distillée

**Muscle ciblé :** Extensor Digitorum Longus (EDL) et soléaire

**Matériels :**  
Force transducer / length servomotor system (model 305B; Cambridge Instruments, Aurora Scientific, Ontario, Canada)

Solution Fille Krebs (à faire le jour même, se conserve entre ½ journée et 1 jour)

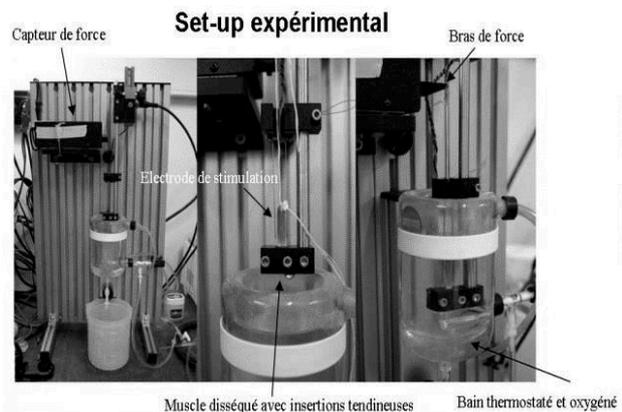
- Glucose 10mM (MM : 180,2) : 0,45g
  - NaHCO<sub>3</sub> 25mM (MM : 105,99) : 0,662g
  - Mannitol 1,1mM (MM : 182,17) : 0,05g
- } A Diluer dans 25 ml de la solution mère puis ajouter 225 ml d'eau distillée pour un volume final de 250 ml

#### Préparation du matériel

1. Allumer le bain-marie à 25°C
2. Saturer la solution fille de Krebs avec un mélange carbogène (95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>) au moins 10 min avant le début des tests afin d'ajuster le pH de la solution à 7.4 et maintenir l'oxygénation durant toute l'expérimentation.

#### Placer le muscle sur l'appareil

1. Faire un nœud autour du tendon du muscle soigneusement disséqué et accrocher l'autre extrémité du fil au dynamomètre.
2. Placer le muscle dans la mâchoire entre les deux électrodes de stimulation (Faire attention à ce que le fil et le muscle ne se vrille pas avant de fermer la mâchoire)
3. Faire remonter le bain de solution fille (25°C et saturé au mélange carbogène)
4. Tendre le système jusqu'à atteindre la longueur optimale (longueur à laquelle la force passive n'augmente plus, entre 0.8 et 1.1 cm pour l'EDL et le soléaire).
5. Laisser le muscle dans le bain 5 minutes avant de commencer les tests.



#### Test de Force-Fréquence

Mesurer la force développée les fréquences suivantes toutes les min.

10Hz ; 30 Hz ; 50Hz ; 80Hz ; 120Hz ; 150Hz pour l'EDL

10Hz ; 20Hz ; 50Hz ; 80Hz ; 100 Hz ; 120 Hz pour le soléaire

La plus grande force développée à la plus grande fréquence est dénommée la force maximale ou Po.

#### Test du fatigue-index

3 minutes après le dernier test de force, effectuer un test de fatigue à basse fréquence:

50Hz pendant 700ms toutes les 2s avec enregistrement continu sur au moins 5 min.

Le temps mis pour atteindre 50% de la force initiale est dénommé temps limite ou index de fatigue.

## Fiche méthodologique n°5

### Dissection des intestins

#### Préparation :

1. Préparer un poste de dissection sur glace (boite remplie de glace avec une plaque de verre).
2. Préparer une seringue avec un cône fixé au bout pour permettre le rinçage des morceaux d'intestin avec du PBS stérile.

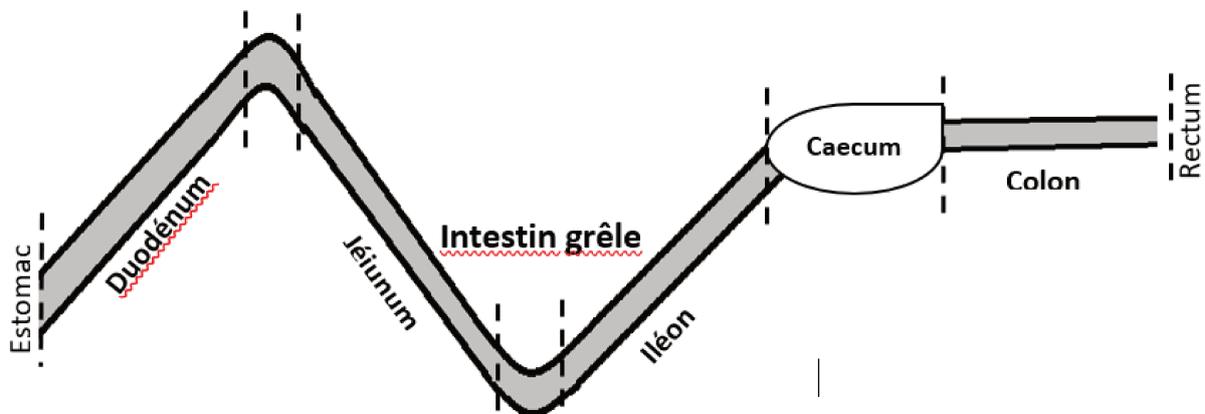
#### Prélèvement :

1. Ouvrir l'abdomen de la souris sans abîmer les viscères
2. Sortir les viscères de l'abdomen en repérant le bas du colon et couper avec un ciseau au plus près du rectum.
3. Délicatement sortir et dérouler les intestins du colon en remontant jusqu'à l'estomac en retirant le tissu adipeux viscéral adhérent.
4. Couper de part et d'autre du caecum pour séparer le colon de l'intestin grêle et couper en dessous de l'estomac
5. Placer l'intestin grêle en N afin de repérer les trois fragments d'intérêts : duodénum, jéjunum et iléon :
6. Chaque portion doit être à peu près équivalente en terme de taille. La taille du colon sert de référence.

**Sujet :** Souris et rats

#### **Matériels :**

- Scalpel
- Bac rempli de glace
- Ciseaux à dissection
- Pincettes
- Boîtes de pétris
- PBS stérile
- Seringue de filtration
- Tips de 200 µl
- Cryotubes
- Azote liquide



7. A l'aide de la seringue modifiée remplie de PBS, laver l'intérieur de chaque portion d'intestin.
8. Le contenu caecal est conservé en vue de dosages complémentaires.
9. Tous les échantillons prélevés sont congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C.



## Fiche méthodologique n°6

### *Dosage du glycogène musculaire et hépatique*

#### **Principe :**

Le glycogène est la forme de stockage du glucose dans les organes. C'est un substrat énergétique très important pour les efforts physiques de moyenne et longue durée. Cette méthode adaptée d'Adamo (1998) et Jansson (1981) permet de doser assez simplement ce glucide complexe.

#### **Préparation :**

1. Mettre le bain sec à 100°C.
2. Peser 20 à 40 mg de tissus (noter le poids) dans un tube Eppendorf de 1.5 ml.

#### **Dosage :**

1. Ajouter dans le tube la solution de PCA 6% (4 µl par mg de poudre dans le tube)
2. Ajouter la solution de HCl 1M (10 µl par mg de poudre dans le tube). Pipeter assez fort le HCl dans le tube de manière à resuspendre au maximum la poudre.
3. Incuber 2h au bain sec à 100°C.
4. Réfrigérer les tubes 10 min sur glace, puis centrifuger 5 min, 3400 rpm à 4°C.
5. Déposer sur une plaque 96 puits 12 µl de gamme, échantillon ou H<sub>2</sub>O par puit (pour le blanc).
6. Déposer 200 µl de GOD-PAP par puit
7. Placer la plaque dans le spectrophotomètre. Faire une agitation douce de 5 s puis laisser incuber 30 min à l'abri de la lumière et à 37°C.
8. Effectuer une lecture à 500 nm, puis répéter la mesure 5 min après.

#### **Organes :**

Foie et muscle

#### **Matériel:**

- Bain sec
- Centrifugeuse réfrigérée
- Pipettes
- Balance de précision
- Synergy Microplate Reader (Bio-Tek)
- Spatule métallique
- Tubes eppendorf 1,5 ml
- Cônes de 10 / 200 et 1000 µl
- Glace pilée ou frigo 4°C
- Plaque 96 puits transparente à fond plat

#### **Solutions:**

- Acide perchlorique 6% (PCA 6%)
- Acide chlorhydrique 1M (HCl 1M)
- GOD-PAP
- Eau bidistillée
- Gamme de glucose préparée dans de l'eau bidistillée (0.35 à 0.005 g/l).

#### **Traitement des données :**

1. Traitement de la gamme : Faire la moyenne des duplicats/triplicats des puits H<sub>2</sub>O pour définir le blanc. Pour chaque point de gamme, faire la moyenne des duplicats/triplicats et en soustraire le blanc. Et insérer un nuage de points en prenant en compte les concentrations des différents points de gamme. Définir l'équation de la droite et son R<sup>2</sup> (R<sup>2</sup> doit être supérieur à 0,98).
2. Traitement des échantillons : Pour chaque échantillon, faire la moyenne des duplicats/triplicats et en soustraire le blanc. Utiliser l'équation de la droite pour définir la concentration de glucose de l'échantillon  $= (valeur + y) / x$ . Ensuite, en déduire le nombre de glycosyl units. La valeur de la concentration doit être relativisée par le nombre de gramme de tissus par litre dans la solution finale (ici 67g/l) par la masse molaire du glucose (160 mol/g) et par le volume de la solution (1l = 1000000 µl), soit la formule :  $concentration / 67 / 160 * 1000000$ .

## Fiche méthodologique n°7

### Electrophorèse des chaînes lourdes de myosine

#### Principe :

L'électrophorèse permet de séparer les différents types des chaînes lourdes de myosine et ainsi de définir la typologie d'un échantillon musculaire.

#### Protocole :

1. Réaliser des extraits protéiques musculaires (Derbré, 2011).
2. Ajouter 240 µl de β-mercaptoéthanol dans 200 ml de tampon interne.
3. Préparer la cuve d'électrophorèse en plaçant le tampon interne entre les plaques de gel et le tampon externe à l'extérieur.
4. Ajouter 5 µl de β-mercaptoéthanol dans l'aliquot de 495 µl de Laemmli spécifique décongelé.
5. Préparer les échantillons dans des volumes de 10 µl contenant 6 µg de protéines (nécessité de faire une dilution au 1/4 ou au 1/6 sur des extraits musculaires).
6. Ajouter 5 µl de Glycérol 40%.
7. Ajouter 10 µl de tampon de Laemmli spécifique.
8. Chauffer les échantillons 5 min à 95°C.
9. Charger les 25 µl dans les puits.
10. Faire migrer pendant 15 min à 120V puis 19h45 à 140V dans la chambre froide (4°C).
11. Sortir les gels et les rincer 15 min dans l'eau bi distillée (3 rinçages de 5 min).
12. Incuber les gels pendant 1h dans la solution fluorescente IRDye® Blue Protein Stain
13. Rincer 3 fois\*5min avec de l'eau bidistillé puis 1h.
14. Révélation sur un révélateur à fluorescence

#### Echantillon :

Extraits protéiques de muscle

#### Solutions (détaillées en fiche n°8) :

- Tris-HCl; pH 8,8
- Tris-HCl; pH 6,8
- Laemmli spécifique voir fiche 8
- Bis-Acrylamide 99:1 (32,32%)
- Tampon interne 1X
- Tampon externe 1X
- IRDye® Blue Protein Stain

#### Gels d'électrophorèses (détaillés en fiche n°8) :

- Gels de séparation
- Gels de concentration

#### Matériel d'électrophorèse Bio-rad

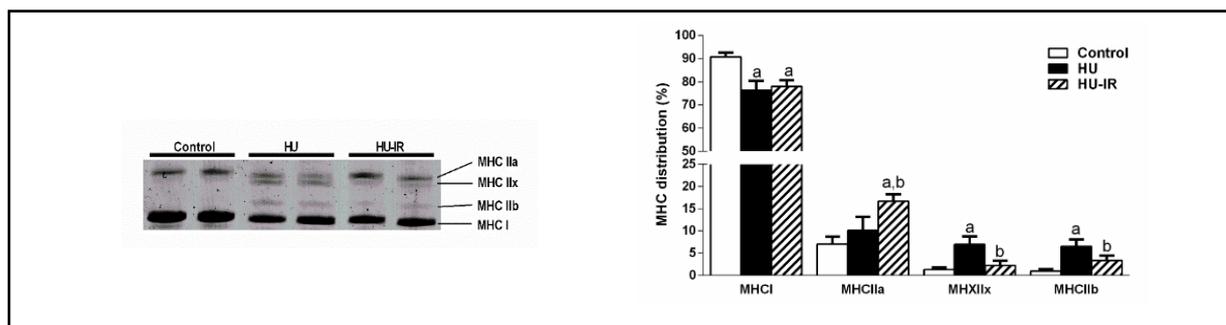
#### Matériel :

- Cuve d'incubation
- Odyssey Infrared Imaging System
- Tubes eppendorff
- Tips
- Pipettes



#### Traitement des données :

L'analyse se fait comme un western blot classique à la différence qu'il n'y a pas de contrôle de charge. Chaque échantillon va être comparé à lui-même. Chaque bande d'une chaîne lourde de myosine est relativisée par rapport au signal total. Ainsi, les données sont exprimées en pourcentage comme illustré ci-dessous.



## Fiche méthodologique n°8

### Solutions et gels de l'électrophorèse des chaînes lourdes de myosine

#### Solutions stock :

<p style="text-align: center;"><b>Laemmlli spécifique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tris 0.5M : 6,4 ml</li> <li>• SDS : 0,8 g</li> <li>• Glycérol : 11 g</li> <li>• EDTA : 0,1 ml</li> <li>• Bleu Bromophénol : 0,002 g</li> <li>• 0,2 µl beta-mercaptoéthanol</li> <li>• Eau bidistillée : 2,3 ml</li> <li>• Volume final 20 ml à aliquoter pour congélation</li> </ul>	<p style="text-align: center;"><b>Bis-Acrylamide 99:1 (32,32%) (20 ml)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 40 µl Bisacrylamide 2%</li> <li>• 15960 µl Acrylamide 40%</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Tris-HCl, pH 8.8</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tris Base : 27,23 g</li> <li>• Eau bidistillée : 80 ml</li> <li>• Ajuster le pH 8,8 avec de l'HCl</li> <li>• QSP avec de l'eau bidistillée à 150 ml</li> </ul>	<p style="text-align: center;"><b>Tris-HCl, pH 6.8</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tris Base : 6 g</li> <li>• Eau bidistillée : 60 ml</li> <li>• Ajuster le pH à 6,8 avec de l'HCl</li> <li>• QSP Eau bidistillée à 100 ml</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>TAMPON INTERNE 1X</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tris Base : 36,34 g</li> <li>• Glycine : 33,78 g</li> <li>• SDS 20% : 15 ml</li> <li>• QSP avec de l'eau bidistillée à 1 l</li> </ul>	<p style="text-align: center;"><b>TAMPON EXTERNE 1X</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tris Base : 6,05 g</li> <li>• Glycine : 5,63 g</li> <li>• SDS 20% : 2,5 ml</li> <li>• QSP avec de l'eau bidistillée à 1 l</li> </ul>

#### Référence des produits :

- 928-40002 IRDye® Blue Protein Stain (LICOR)
- Bisacrylamide 2% solution (Sigma- M1533)
- Acrylamide 40% (Sigma- A4058)



#### Gels d'électrophorèse :

##### Préparation du gel de séparation (7,5%) pour 2 gels de 1,5mm

- 2154 µl d'Eau Bidistillée
- 2880 µl de Tris-HCl 1.5M 8,8
- 11,34 ml de Glycérol 99,5%
- 2160 µl de Glycine 1M
- 432 µl de SDS 20%
- 6246 µl de Bis-Acrylamide 99:1 (32,32%)
- 324 µl d'APS 10%
- 16 µl de TEMED

- Couler le gel entre les plaques de verre en remontant jusqu'à 0,5 cm du peigne
- Ajouter de l'eau bidistillée avec une pipette pasteur pour faire disparaître les bulles et de manière à obtenir une surface plane
- Après polymérisation, enlever l'eau bidistillée

##### Préparation du gel de concentration (4,5%) pour 2 gels de 1,5mm

- 2584 µl d'Eau Bidistillée
- 1008 µl de Tris-HCl 0.5M 6,8
- 3,4 ml de Glycérol 99,5%
- 288 µl d'EDTA 0,2M pH 7
- 144 µl de SDS 20%
- 1044 µl de Bis-Acrylamide 99 :1 (32,32%)
- 108 µl d'APS 10%
- 5,5 µl de TEMED

- Couler le gel entre les plaques de verre en remontant jusqu'en haut des plaques puis ajouter le peigne
- Après polymérisation, retirer les peignes et rincer les puits avec une pipette d'eau bidistillée.

## Fiche méthodologique n°9

### *Extraction d'ADN génomique bactérien d'origine fécale*

#### **Principe :**

Cette technique permet l'étude des écosystèmes bactériens et leur quantification. En effet, pour obtenir l'abondance des différentes familles bactériennes dans un prélèvement de selles, il est nécessaire d'effectuer l'extraction d'ADN génomique bactérien. Cette technique est une adaptation du kit G'Nome (MPBio) (Furet et al., 2009).

#### **Protocole :** *Préparation du lysat bactérien*

1. Peser entre 40 et 200 mg de selle dans le tube de 2 ml à vis.
2. Homogénéiser en ajoutant 600 µl de *Cell suspension solution*
3. Ajouter 100 µl de *Cell lysis/denaturing solution*, mélanger vigoureusement 30 s au vortex.
4. Incuber 30 min à 55°C dans le thermomixeur à 900 rpm (préparer le PVPP pour étape 9).
5. Ajouter 25 µl de *Protease mixx* (stocké à 4°C) et homogénéiser au vortex
6. Incuber 120 min à 55°C sous agitation 900 rpm.
7. Ajouter 750 µl de billes de verre 0.1mm
8. Mettre les échantillons 3 fois 20 sec. dans un fast-prep.
9. Centrifuger 15-20 s (pour enlever la mousse), ajouter entre 15 mg (maxi 20 mg) de PVPP dans chaque tube et bien homogénéiser au vortex pendant 30 sec.
10. Centrifuger 3 min à 20 000 g
11. Récupérer le surnageant dans un nouveau tube eppendorf stérile (2.2 ml)
12. Ajouter 400 µl de TENP (stocké à 4°C) sur le culot et bien homogénéiser au vortex (retourner le tube pour remettre le culot en suspension) puis centrifuger 3 min à 20 000g. Cette étape est renouvelée 3 fois.
13. Pooler les surnageants avec le premier obtenu étape 10.
14. Centrifuger 3 min à 20000 g la totalité des surnageants récupérés pour éliminer les dernières billes en suspension, le volume total est d'environ 1500 µl.

#### *Extraction d'ADN bactérien*

15. Prélever 750 µl de surnageant dans un nouveau tube eppendorf stérile de 2,2 ml, et conserver le reste à -20°C jusqu'à validation des résultats de quantifications des bactéries par PCR quantitative.
16. Ajouter 1 ml d'Isopropanol froid (stocké à -20°C) et mélanger délicatement par retournement. Laisser 10 min à -20°C. Centrifuger 5 min à 20 000g, vider le surnageant.
17. Sécher le culot au speed vac 5 min, ou sous la sorbonne.
18. Reprendre le culot d'ADN dans 400 µl d'H<sub>2</sub>O de qualité biologie moléculaire (laisser toute la nuit à +4°C).
19. Précipitation des protéines : Ajouter 100 µl de « *salt-out* » *mixture*, mélanger par retournements et placée dans la glace pendant 10 min. Centrifuger 10 min à 20 000 g. Remettre le surnageant dans un nouveau tube eppendorf stérile de 2.2 ml.
20. Ajouter 1.5 ml d'éthanol 100% froid (stocké à -20°C) et mélanger délicatement par retournements. Laisser 5 min à température ambiante.
21. Centrifuger 5 min à 20 000 g. Eliminer le surnageant.
22. Reprendre le culot d'ADN dans 1 ml d'éthanol 70%, agiter au vortex. Centrifuger 5 min à 20 000 g. Eliminer le surnageant. Sécher le culot au speed vac 5 min
23. Reprendre le culot avec 100 µl de tampon TE (laisser à 4°C toute la nuit).
24. Ajouter 50 µl de *RNase du mix*, incuber 30 min à 55°C au thermomixeur à 300 rpm.
25. Les échantillons sont dilués au 1/10000 pour quantification par Q-PCR « all-bacteria » et conserver à -20°C.

#### **Sujets :**

Souris, Rats,  
humains

#### **Echantillon :**

Selle ou contenu caecal (entre 40 et 200 mg)

#### **Matériel :**

Détaillé en fiche n°10

#### **Solutions :**

Détaillées en fiche n°10

Kit G'Nome Bio101 (MP Bio research)

## Fiche méthodologique n°10

### *Matériel et solutions pour l'extraction d'ADN bactérien d'origine fécal*

#### **Matériel :**

- Centrifugeuse non réfrigérée avec rotor permettant de tourner à 20000 g des tubes eppendorf de 1.5 ou 2.2 ml.
- Speed-Vac concentrator
- Bead-Beater™ (Amalgateur)
- Tubes stériles : de type eppendorf 2.2 ml et Tube bouchon à vis de 2 ml
- Billes de verre 0.1 mm (Grosseron ref : B033108)
- Cures dents stériles
- Poubelles de paille avec sac jetable

#### **Solutions et réactifs :**

<b>Préparation des solutions</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>EDTA pH 8, 0.5M</b> (chauffer pour dissoudre)               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ MM : 372.2 g.mol<sup>-1</sup></li> <li>○ Peser 9.305 g pour 50 ml d'H<sub>2</sub>O stérile</li> <li>○ Ajuster pH avec NaOH</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Tris-HCl pH 8, 1M</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ MM : 121.1 g.mol<sup>-1</sup></li> <li>○ Peser 6.05 g pour 50 ml d'H<sub>2</sub>O stérile</li> <li>○ Ajuster pH avec HCl concentré</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>TENP</b> (50 mM Tris pH 8, 20 mM EDTA pH 8, 100 mM NaCl, 1 % PVPP)               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 20 ml d'H<sub>2</sub>O stérile</li> <li>○ 1.5 ml de Tris-HCl pH 8, 1M</li> <li>○ 1.2 ml d'EDTA pH 8, 0.5M</li> <li>○ 0.6 ml de NaCl 5M</li> <li>○ 0.3 g de PVPP</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>NaCl 5M</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ MM : 58.44 g.mol<sup>-1</sup></li> <li>○ Peser 14.61 g pour 50 ml d'H<sub>2</sub>O stérile</li> </ul> </li> </ul>
<b>Réactifs (chimique et biologique)</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Kit G'Nome Bio101 MP Bio ref : 2010-600 :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>Cell Lysis/denaturing Solution</i></li> <li>○ <i>RNase Mixx</i></li> <li>○ <i>Protease Mixx</i></li> <li>○ <i>Salt-Out Mixture</i></li> <li>○ <i>Cell Suspension Solution</i></li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>PVPP</b> (PolyVinylPolyPyrrolidone) Sigma</li> <li>• <b>Isopropanol</b> (stocké à -20°C)</li> <li>• <b>Ethanol 100%</b> (stocké à -20°C)</li> <li>• <b>Ethanol 70%</b> (stocké à -20°C)</li> <li>• <b>Tampon TE 1X</b> (Tris 10 mM pH 8.0 – EDTA 1 mM)</li> </ul>

## Fiche méthodologique n°11

### *Extraction d'ADN musculaire et dosage de l'ADN mitochondrial*

#### **Principe :**

Extraction d'ADN total de muscle de souris par une lyse suivie par une étape phénol-chloroforme puis d'une quantification relative de l'ADN mitochondrial par rapport à l'ADN génomique.

#### **Extraction d'ADN total :**

1. Préparer le mix protéinase K et tampon de lyse « Direct PCR lysis tail » en respectant un volume de 250 µl de tampon et 1 µl de protéinase K pour 10mg de poudre de muscle
2. Ajouter 250 µl de ce mix dans chaque tube
3. Digestion au bain marie 55°C toute la nuit sous agitation.
  1. Placer les tubes au bain sec à 85°C pendant 45 minutes.
  2. Centrifuger 10 s afin de culoter les débris au fond du tube.
  3. Transférer le surnageant (contenant l'ADN) dans un tube Eppendorf de 1.5 ml
4. Ajouter 1 volume de solution phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) et vortexer.
5. Centrifuger 5 min à 16000 g
6. Prélever la phase supérieure (contenant l'ADN)
7. Ajouter l'acétate d'ammonium 7.5M (0.5 fois le volume de phase supérieure)
8. Précipiter l'ADN en ajoutant 2.5 volumes d'éthanol 100%, homogénéiser doucement et placer à -20°C toute la nuit.
9. Centrifuger 4°C, 30 min à 16000 g et laver le culot 3 fois avec 150 µl d'éthanol 70%.
10. Laisser sous hotte le culot sécher pendant 15 minutes.
11. Reprendre le culot avec 200 µl d'eau qualité biologie moléculaire.
12. Mesurer la quantité d'ADN sur spectrophotomètre, sachant qu'1 unité de  $DO_{260m} = 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  d'ADN et que le rapport A260/A280 doit être compris entre 1.7 et 1.9.
13. Conserver les ADN à -20°C.

#### **Echantillon :**

Poudre de muscle cryobroyé

#### **Réactifs :**

- **Solution mère de protéinase K :** Qbiogene, réf : PROTK500 ou Dutscher Réf : 091553.
- Aliquots de 20 µl conservés à -20°C à 50 mg/ml, dilution dans H<sub>2</sub>O milliQ.
- **Tampon de lyse :** Viagen Euromedex « Direct PCR lysis tail » Réf : 102-T
- **Acétate d'ammonium 7.5M :** pour 20 ml, peser 11.56 g d'acétate d'ammonium, ajouter 10 ml d'H<sub>2</sub>O distillée, vérifier que le pH est de 7, ajuster le volume à 20 ml puis filtrer sur un filtre de 0.22 µm.
- **Ethanol 100%, Ethanol 70%,** Eau qualité biologie moléculaire
- **Solution de Biophenol /chloroform /isoamylic alcohol :** Quantum Appligen ref : PHEC0001-partA

#### **Dosage de l'ADN mitochondrial :**

1. Par PCR quantitative, on réalise la quantification de l'ADN mitochondrial par mesure de deux gènes mitochondriaux (ND2 et ND5) relativement à un gène de référence de l'ADN génomique (ATP5b).

Les amorces utilisées sont listées dans le tableau ci-dessous :

Gène	Espèce	Référence	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
ATP5b	Mouse	NC_000076	GTTTGCTGAAGCCCACTCA	CATGATTCTGCCCAAGGTCT
ND2	Mouse	NC_005089.1	AAGGGATCCCCTGACATA	AGTCCTCTCATGCCCTAT
ND5	Mouse	NC_005089.1	ATAACCGCATCGGAGACATC	GAGGCCAAATTGTGCTGATT

2. Les résultats sont exprimés en  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  en utilisant la moyenne des Ct de ND2 et ND5 avec ATP5b comme gène de référence.

## Fiche méthodologique n°12

## Récapitulatif des oligonucléotides (5'–3') utilisés dans le cadre d'analyses par QPCR

SOURIS				
Fonction	Gène	Référence	Forward	Reverse
<b>MUSCLE SQUELETTIQUE</b>				
Turnover protéique	<i>Igf-1</i>	XM_006513261.2	AGCAGCCTTCCAACCAATTAT	GAAGACGACATGATGTGTATCTTTATC
	<i>FoxO3a</i>	XM_006512806.1	GGAAATGGGCAAAGCAGA	AAACGGATCACTGTCCACTTG
	<i>Murf1 (Trim63)</i>	NM_001039048.2	TCCTGCAGAGTGACCAAGG	GGCGTAGAGGGTGTCAAAC
Inflammation	<i>Trif (Ticam1)</i>	NM_174989.4	CAGCTCAAGACCCCTACAGC	CTCCACACAGCCTCGTC
Transport des lipides	<i>CD36</i>	NM_001159557.1	CAGATCCGAACACAGCGTAG	GCGACATGATTAATGGCACA
Métabolisme mitochondrial	<i>Cpt1</i>	NM_009948.2	CATCCCAGGCAAAGAGACA	AAGCGACCTTTGTGGTAGACA
	<i>Nrf-1</i>	NM_001164226	GGTGGGGGACAGATAGTAGTCT	ATGCTCACAGGGATCTGGAC
<b>ILEON</b>				
Métabolisme du glucose et des lipides	<i>Fiaf (Angptl4)</i>	NM_020581.2	GGGACCTTAAGTGTGCAAG	GAATGGCTACAGGTACCAAACC
Inflammation	<i>Myd88</i>	NM_010851.2	GCCTTGTTAGACCGTGAGGAT	CTAAGTATTTCTGGCAGTCTCTCT
	<i>Tlr4</i>	NM_021297.3	GGACTCTGATCATGGCACTG	CTGATCCATGCATTGGTAGGT
	<i>Nf-κB</i>	NM_008689.2	TGAGGACGGGGTATGCAC	TCACATGAAGTATCCCAGGTTT
Récepteurs des AACR	<i>Lat-1</i>	NM_011404.3	ATGTGGCTCCGATTCAAGA	GGAGGGCCAGATTCACT
Récepteur des acides gras à chaîne courte	<i>Gpr40 (Ffar1)</i>	NM_194057.2	AGGCGCTCTCCTCACACTC	CTAGCCACATTGGAGGCATTA
Récepteur des acides gras à chaîne moyenne	<i>Gpr41 (Ffar3)</i>	NM_001168509.1	TGCTCTGAAGAAGCCAATCA	TTCTCTCTGGTCCAGTGCT
Récepteur des acides gras à chaîne longue	<i>Gpr120 (Ffar4)</i>	NM_181748.2	TTGGTGTGAGCGTCGTG	CCAGCAGTGAGACGACAAAAG
Transporteur du glucose	<i>Sglt1</i>	NC_000071.6	CTGGCAGGCCGAAGTATG	TTCCAATGTTACTGGCAAAGAG
<b>GENES DE MENAGE</b>				
Gènes de référence	<i>Arp (Rplp0)</i>	NM_007475.5	ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG	TCCCACCTTGTCTCCAGTCT
	<i>α-Tubulin</i>	NM_011653.2	CTGGAACCCACGGTCATC	GTGGCCACGAGCATAGTTATT

RAT				
Fonction	Gène	Référence	Forward	Reverse
<b>MUSCLE SQUELETTIQUE / FOIE / RATE</b>				
Inflammation	<i>IL-6</i>	NM_012589.2	TCCGAAGAGACTTCCAGC	GTCTGTTGTGGTGGTATCCTCT
<b>FOIE</b>				
Gènes dépendants de la voie JAK/STAT-3	<i>C-Reactive Protein</i>	NM_017096.3	AGGCTTTTGGTCATGAAGACATG	CTTCGGCTCACATCAGCGT
	<i>Haptoglobine</i>	NM_012582.2	AACACTTGGTTCGTTATCGCTG	CCACACTGCCTCACACTTG
	<i>Hepcidin</i>	NM_053469.1	CTGCAGCCTTGGCATGG	CAGCAGCGCA CTGTCATCA
<b>GENE DE MENAGE</b>				
Gènes de référence	<i>Gapdh</i>	NM_017008.4	GGTCGGTGTGAACGATTG	CGTGGGTAGAGTCATACTGGAACA
	<i>Hprt1</i>	XM_008773659.2	CTGATTATGGACAGGACTGAAAGAC	CCAGCAGGTCAGCAAAGAACT
	<i>Rpl4</i>	NM_022510.1	CGAGCACCACGCAAGAAGAT	ATTCTAGCCTGGCGGAGAA
	<i>RPL19</i>	NM_031103.1	CAATGCCAACTCTCGTCAACAG	CATCCAGGTCACCTTCTCGG

## Fiche méthodologique n°13

## Récapitulatif des anticorps utilisés dans le cadre d'analyses par Western-Blot

SOURIS					
Fonction	Protéine	Poids moléculaire (kDa)	Référence	Source	Dilution
<b>MUSCLE SQUELETTIQUE</b>					
<b>Turnover protéique</b>	4EBP1	17	Cell Signaling, 9644	lapin	1:1000
	p-4EBP1 <sup>Thr37/46</sup>	17	Cell Signaling, 2855	lapin	1:1000
	RPS6	32	Cell Signaling, 3944	lapin	1:1000
	p-RPS6 <sup>Ser235/236</sup>	32	Cell Signaling, 4856	lapin	1:1000
	PRAS40	40	Cell Signaling, 2691S	lapin	1:1000
	p-PRAS40 <sup>T246</sup>	40	Cell Signaling, 13175S	lapin	1:1000
<b>Stress énergétique</b>	LC3b	14	Cell Signaling, 3868	lapin	1:1000
	AMPK $\alpha$	62	Cell Signaling, 5832	lapin	1:1000
	p-AMPK $\alpha$ <sup>THR172</sup>	62	Cell Signaling, 2535	lapin	1:1000
<b>Métabolisme mitochondrial</b>	PGC-1 $\alpha$	105	Calbiochem, 516557	lapin	1:1000
	COX IV	17	Santa Cruz, sc-69360	Souris	1:200

RAT					
Fonction	Protéine	Poids moléculaire (kDa)	Référence	Source	Dilution
<b>MUSCLE SQUELETTIQUE</b>					
<b>Turnover protéique</b>	4EBP1	15-20	Cell Signalling, 9452	lapin	1/1000
	p-4EBP1-Thr37/46	15-20	Cell Signalling, 2855	lapin	1/1000
	AKT	60	Cell Signalling, 9272	lapin	1/1000
	p-AKT-Ser473	60	Cell Signalling, 9271	lapin	1/1000
	Ubiquitine	profil	Cell Signalling, 3933	lapin	1/1000
<b>FOIE</b>					
<b>Voie promotrice de la transcription d'hepcidine</b>	ERK1-2	42	Cell Signalling, 9102	lapin	1/1000
	p-ERK1-2-Thr202-Tyr204	42	Cell Signalling, 9101	lapin	1/1000
	SMAD5	60	Cell Signalling, 9517	lapin	1/1000
	p-SMAD1/5/8-Ser463/465	60	Abcam, ab92698	lapin	1/1000
	STAT3	88	Cell Signalling, 9132	lapin	1/1000
	p-STAT3-Tyr705	88	Cell Signalling, 9131	lapin	1/1000
<b>CONTRÔLE DE CHARGE</b>					
<b>Contrôle de charge</b>	Actine	37	Sigma Aldrich, A2172	Souris	1/700
	HSC70	70	Cell Signalling, 9271	Souris	1/1000

## II. Curriculum Vitæ (anglais)

## Kévin Nay

Current position	Contact
Ph.D Student, Sport and Muscular Physiology	18 rue Liothaud
Laboratoire Mouvement Sport Santé (M2S)	35000 Rennes - FRANCE
Université Rennes 2	(+33)6 9833 5203
FRANCE	kevin.nay@inra.fr
www.m2slab.com	skype: nay.kevin

### Education

<b>Ph.D – Sport and Muscular Physiology</b>	Present
UMR866 DMEM - INRA - Montpellier, France   M2S Lab - Univ Rennes - Rennes, France	
<b>MSc - Biology, Muscular Physiology and Related Pathologies</b>	2016
Université Claude Bernard - Lyon, France	
<b>BSc - Sport and Physical Education Science</b>	2014
Université Jean Monnet - Saint-Etienne, France	

### Employment

<b>Ph.D Student</b> , INRA – Université de Rennes, Montpellier – Rennes, France	10/2016 – Present
<b>Research Officer Trainee</b> , M2S Lab, Rennes, France	11/2014 – 10/2016
<b>Part-Time Teacher</b> , Université Jean-Monnet, Saint-Etienne, France	02/2014 – 04/2014
<b>Personal Physical Preparer</b> , Kévin "Kap" Hemy, Saint-Etienne, France	10/2013 – 06/2014
<b>Lifeguard</b> , A corps et Accord, Villeurbanne, France	06/2013 – 12/2015
<b>Basketball Coach</b> , Saint-Etienne BTS, Saint-Etienne, France	09/2012 – 06/2014
<b>Basketball Coach</b> , ASR, Rozier-en-Donzy, France	09/2012 – 06/2013
<b>Sport Camp Monitor</b> , (Summer Job), CDSA69, Lyon, France	07/2011 – 08/2016

### Other qualifications

Animal experimentation – Conceptor Level 1, Nantes, France	2019
English as a Second Language : TOEIC score = 765/990, Rennes, France	2016
French Sign Language (LSF) : Level A1-2, Saint-Etienne, France	2014
Animator – Lifeguard : BAFA – SB, Clermont-Ferrand, France	2011
First Aid rescuer : PSC1, Montbrison, France	2009

## **RESEARCH**

### **Publications**

[h-index] = 2

16 citations (According to Google Scholar; 17/08/2019)

#### **Articles published in peer-reviewed journals**

1. Kenawi M, Rouger E, Island ML, Leroyer P, Robin F, Remy S, Anegon I, **Nay K**, Derbré F, Brissot P, Ropert M, Cavey T, Loréal O. Imbalance between hepatocyte and macrophage iron distribution confirms the singularity of aceruloplasminemia in a new knockout rat model. Accepted In The FASEB Journal (August 26<sup>th</sup> 2019).

2. **Nay K**, Jollet M, Goustard B, Baati N, Vernus B, Pontones M, Lefeuvre-Orfila L, Bendavid C, Rué O, Mariadassou M, Bonnieu A, Ollendorff V, Lepage P, Derbré F & Koechlin-Ramonatxo C (2019). Gut bacteria are critical for optimal muscle function: a potential link with glucose homeostasis. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism; DOI: 10.1152/ajpendo.00521.2018.

3. Appriou Z, **Nay K**, Pierre N, Saligaut D, Lefeuvre-Orfila L, Martin B, Cavey T, Ropert M, Loréal O, Rannou-Bekono F, Derbré F. Skeletal muscle ceramides do not contribute to physical inactivity-induced insulin resistance. Appl Physiol Nutr Metab. doi: 10.1139/apnm-2018-0850. 2019.

4. Arena G, Cissé MY, Pyrdziak S, Chatre L, Riscal R, Fuentes M, Arnold JJ, Kastner M, Gayte L, Bertrand-Gaday C, **Nay K**, Angebault-Prouteau C, Murray K, Chabi B, Koechlin-Ramonatxo C, Orsetti B, Vincent C, Casas F, Marine J-C, Etienne-Manneville S, Bernex F, Lombès A, Cameron CE, Dubouchaud H, Ricchetti M, Linares LK, Le Cam L. Mitochondrial MDM2 Regulates Respiratory Complex I Activity Independently of p53. Mol Cell 69: 594-609.e8, 2018.

5. Cavey T, Pierre N, **Nay K**, Allain C, Ropert M, Loréal O, Derbré F. Simulated microgravity decreases circulating iron in rats: role of inflammation-induced hepcidin upregulation. Exp Physiol 102: 291–298, 2017.

#### **Articles currently submitted to peer-reviewed journals**

1. **Nay K**, Martin DJ, Orfila L, Saligaut D, Martin B, Horeau M, Cavey T, Kenawi M, Island ML, Ropert M, Loréal O, Koechlin-Ramonatxo C, Derbré F. Intermittent reloading prevents microgravity-induced muscle atrophy, but not iron misdistribution. In **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**.

2. Perrin T, Faure C, **Nay K**, Cattozzo G, Sorel A, Kerhervé H, Bideau B, Kulpa R. Paving the way to exergaming: lessons from physiological assessment during virtual reality gaming. In Sport.

#### **Conference articles (with selection committee)**

1. **Nay K**, Jollet M, Goustard B, Baati N, Vernus B, Pontones M, Lefeuvre-Orfila L, Bendavid C, Rué O, Mariadassou M, Bonnieu A, Ollendorff V, Lepage P, Derbré F & Koechlin-Ramonatxo C. Gut bacteria are critical for optimal muscle function : a potential link with glucose homeostasis. Poster presented at the 3<sup>rd</sup> national meeting of the french Physiology society; Montpellier, France, 12<sup>th</sup>-14<sup>th</sup> June 2019.

2. Martin DJ, **Nay K**, Orfila L, Saligaut D, Kenawi M, Island ML, Cavey T, Ropert M, Loréal O, Derbré F. Effects of intermittent muscle reconditioning on alterations of iron distribution and availability during simulated microgravity. Poster presented at the 3<sup>rd</sup> *national meeting of the french Physiology society*; Montpellier, France, 12<sup>th</sup>-14<sup>th</sup> June 2019.
3. Martin DJ, **Nay K**, Dufresne S, Noirez P, Ghuskayan G, Loréal O, Rebillard A, Derbré F. Iron metabolism is differently regulated depending on muscle fiber phenotype. Poster presented at the 3<sup>rd</sup> *national meeting of the french Physiology society*; Montpellier, France, 12<sup>th</sup>-14<sup>th</sup> June 2019.
4. Jollet M, Baati N, Vernus B, **Nay K**, Bonniou A, Ollendorff V, Lepage P, Goustard B, Koechlin-Ramonatxo C. (2018) Is skeletal muscle remodeling associated with gut microbiota signature ? Oral presentation at the 6<sup>th</sup> *World Congress on Targeting Microbiota*; Porto, Portugal, 28<sup>th</sup>-30<sup>th</sup> October 2018.
5. **Nay K**, Jollet M, Goustard B, Baati N, Vernus B, Bonniou A, Ollendorff V, Lepage P, Derbré F, Koechlin-Ramonatxo C. (2018) Gut microbiota dysbiosis induced by antibiotic treatment and reseeded : functional and metabolic impacts on skeletal muscle. Oral presentation at the 23rd Annual Congress of the *European College of Sport Science*; Dublin, Ireland, 4<sup>th</sup>-7<sup>th</sup> July 2018.
6. Perrin T, Faure C, **Nay K**, Cattozzo G, Sorel A, Kerhervé H, Bideau B, Kulpa R. (2018) Physiological loading during an active virtual reality game. Poster presented at the 23rd Annual Congress of the *European College of Sport Science*; Dublin, Ireland, 4<sup>th</sup>-7<sup>th</sup> July 2018.
7. Derbré F, Pierre N, **Nay K**, Cavey T, Lefeuvre-Orfila L, Saligaut D, Allain C, Ropert M, Loréal O. (2018) Role of skeletal muscle atrophy and inflammation in microgravity-induced iron misdistribution. Potential perspectives to fight spaceflight anemia. Oral presentation at the 39<sup>th</sup> annual *International society for gravitational physiology meeting & European space agency meets Health initiative*; Noordwijk, The Netherlands, 18<sup>th</sup>-22<sup>nd</sup> June 2018.
8. **Nay K**, Pierre N, Cavey T, Allain C, Ropert M, Loréal O, Koechlin-Ramonatxo C, Derbré F. (2017) La biodisponibilité du fer est affectée par la microgravité chez le rat. Oral presentation at the 17th Congress of the *Association des Chercheurs en Activités Physique et Sportives (ACAPS)*; Dijon, France, 29<sup>th</sup>-31<sup>st</sup> October 2017
9. **Nay K**, Jollet M, Goustard B, Baati N, Vernus B, Bonniou A, Ollendorff V, Lepage P, Derbré F, Koechlin-Ramonatxo C. (2017) Modulation of skeletal muscle function by gut microbiota dysbiosis and reseeded. Oral presentation at the 5th *World Congress on Targeting Microbiota*; Berlin, Germany, 26<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> October 2017
10. Pierre N, Appriou Z, **Nay K**, Lefeuvre-Orfila L, Saligaut D, Martin B, Derbré F. (2016) Early insulin resistance induced by physical inactivity is associated with a reduction in muscle GLUT4 content, and not to defects in skeletal muscle insulin signaling. Oral presentation at the 21st Annual Congress of the *European College of Sport Sciences*; Vienne, Austria, 6<sup>th</sup>-9<sup>th</sup> July 2016.
11. Cavey T, Pierre N, **Nay K**, Allain C, Ropert M, Derbré F, Loréal O. (2016) Muscle disuse induces hepcidin expression through IL-6/STAT3 signaling and decreases serum iron bioavailability in rats. Poster presented at the *European Iron Club*; Innsbruck, Austria, 7<sup>th</sup>-9<sup>th</sup> April 2016.

**Theses**

Nay K. (In progress. Planned end : October 2019) Crosstalk between gut microbiota and skeletal muscle.

**Grants and Awards**

Ecole Doctorale Biologie Santé (BS) / INRA - Grant for Formation	625 Eur	2018
Univ Rennes – Grant for conference travel	400 Eur	2017

**TEACHING****Undergraduate courses**

Total : 140 hours

Physiological approach of sport performance

BSc (Univ Rennes) - lectures, practical classes (3\*4hr) 2018-2019

Performance field test

BSc (Univ Rennes) – lectures, practical classes (3\*18hr) 2018-2019

Performance Evaluation

BSc (Univ Rennes) - lectures, practical classes (10\*4hr) 2017-2019

Scientific Basis of Sport Sciences (Physiology, Biomechanics and Anatomy)

BSc (Univ Rennes) – lectures, practical classes (2\*17hr) 2017-2018

BSc (Université Jean Monnet) – Tutoring for freshmen (20hr) 2013-2014

**Research supervision and mentoring**Supervision and training :

Mr. Mathieu Horeau (MSc) : 2018-2019

Mr. David Martin (MSc) : 2017-2019

**SCIENTIFIC / TECHNICAL SKILLS****Molecular biology**

Quantitative PCR, RNA/DNA extraction/quantification, Mitochondrial DNA extraction/quantification, Bacterial DNA extraction/purification.

**Protein**

Protein extraction, Protein quantification, Western Blotting, ELISAs, MHC electrophoresis/quantification.

**Histopathology**

Rotary Microtome, Cryostat Microtome, Nanozoomer, Staining, Skeletal Muscle Cross Sectional Area Quantification.

**Biochemistry**

Glycogen Content Quantification

**Animal Experimentation**

Animal Care (Mouse and Rats), Hindlimb-Unloading, Rodent Physical Training, Chemical Treatment, OGTT, Endurance Running Test, Injection, Anesthesia, Euthanasia, Dissection, *Ex-Vivo* Muscle Contractile activity and Insulin Challenge.

**Cardiorespiratory measurement**

VO<sub>2</sub>, ECG, NIRS.

**Computer**

Microsoft Office, Zotero, Graphpad Prism, Odyssey, Biorad CFX Manager, ImageJ.

## **ADMINISTRATION AND ENGAGEMENT**

### **Service for research publication (Reviewer)**

PLOS ONE - indexed, 2016 impact factor = 2.806 2 completed reviews

2018-present

## **ACADEMIC REFEREE**

**Frédéric Derbré, Ph.D.** *Relationship: Ph.D supervisor and mentor*

Associate Professor, Exercise Physiology  
Movement Sport and Health laboratory (M2S)  
Univ Rennes  
Bruz, France  
Email: [frederic.derbre@univ-rennes2.fr](mailto:frederic.derbre@univ-rennes2.fr)

**Christelle Koechlin-Ramonatxo, Ph.D.** *Relationship: Ph.D supervisor and mentor*

Associate Professor, Exercise Physiology  
UMR 866 DMEM - INRA  
University of Montpellier  
Montpellier, France  
Email: [christelle.ramonatxo@inra.fr](mailto:christelle.ramonatxo@inra.fr)

**Vincent Ollendorff, Ph.D.** *Relationship: co-author and mentor*

Researcher, Biology  
UMR 866 DMEM - INRA  
Montpellier, France  
Email: [Vincent.ollendorff@inra.fr](mailto:Vincent.ollendorff@inra.fr)

**Hugo Kerhervé, Ph.D.** *Relationship: co-author and mentor*

Associate Professor, Exercise Physiology  
Movement Sport and Health laboratory (M2S)  
Univ Rennes  
Bruz, France  
Email: [hugo.kerherve@univ-rennes2.fr](mailto:hugo.kerherve@univ-rennes2.fr)

**Bénédicte Goustard, Ph.D.** *Relationship: co-author and mentor*

Research Engineer, Biology  
UMR 866 DMEM - INRA  
Montpellier, France  
Email: [benedicte.goustard@inra.fr](mailto:benedicte.goustard@inra.fr)



**Titre :** Le fer et le microbiote intestinal : deux nouvelles cibles pour améliorer les capacités fonctionnelles et musculaires en condition d'hypoactivité

**Mots clés :** Protéosynthèse – Dysbiose – Fatigue Musculaire – Propriétés Contractiles

**Résumé :** L'hypoactivité est caractérisée par une absence de contraintes sur le système musculo-squelettique. Il est aujourd'hui reconnu que les astronautes en impesanteur ainsi que les personnes hospitalisées et/ou alitées subissent ce phénomène. Ceci ayant pour conséquence de diminuer leurs capacités fonctionnelles en altérant notamment la fonction musculaire et le transport d'oxygène. Afin d'améliorer la santé des astronautes en mission tout comme la prise en charge des patients alités, il apparait nécessaire de mieux comprendre l'étiologie des altérations physiologiques induites par l'hypoactivité. Présentant des interactions potentielles avec le muscle squelettique, le métabolisme du fer et le microbiote intestinal constituent des cibles innovantes pouvant jouer un rôle dans ces altérations. L'objectif de ce travail de thèse est

d'étudier les relations existantes entre microbiote intestinal, fer et muscle squelettique en condition d'hypoactivité et d'en décrire les mécanismes sous-jacents. En s'appuyant sur des modèles animaux et humains, nos travaux mettent en évidence une redistribution du fer dans l'organisme du sujet hypoactif, provoquée en grande partie par une augmentation de la synthèse d'hepcidine. Travail princeps démontrant un impact de la modulation du microbiote intestinal sur l'endurance du muscle squelettique, nos résultats pointent le métabolisme du glucose comme un acteur potentiel, alors que des indices de dysbiose en condition d'hypoactivité sont suggérés. L'ensemble de ce travail ouvre sur de nouvelles contre-mesures et stratégies thérapeutiques innovantes dans la prise en charge de la santé des astronautes et des patients alités.

**Title :** Iron and gut microbiota: new targets to prevent functional and muscle decline due to hypoactivity

**Keywords :** Proteosynthesis – Dysbiosis – Muscle Fatigue – Contractile Property

**Abstract :** Hypoactivity is characterized by a lack of mechanical constraints on the musculoskeletal system, and affects a wide range of individuals, from bedridden and hospitalized patients, to astronauts subjected to hypoactivity. Specifically, hypoactivity reduces functional abilities by altering, among others, muscle function and oxygen transport. To improve astronauts' health during and after missions, or bedridden patients' care, understanding its underlying mechanisms is necessary. Since they seem to interact with skeletal muscle, iron metabolism and gut microbiota could play a key role in functional disorders related to hypoactivity. The aim of this PhD thesis was to study the crosstalk between

gut microbiota, iron and skeletal muscle during hypoactivity and to identify the underlying mechanisms. Based on animal and human models, our work highlights that iron misdistribution occurs during hypoactivity, especially due to hepcidin upregulation. By demonstrating for the first time the effect of gut microbiota on skeletal muscle endurance, our results support that glucose homeostasis plays a key role in this mechanism. Furthermore, some indicators of gut dysbiosis are suggested in hypoactivity. Our work opens promising and innovative countermeasures for therapeutic strategies destined to improve astronauts' health and patients' care.