



HAL
open science

Effets de deux modalités d'entraînement et d'une complémentation à base d'extraits végétaux sur le développement du diabète de type 2: Physiologie

Vivien Chavanelle

► To cite this version:

Vivien Chavanelle. Effets de deux modalités d'entraînement et d'une complémentation à base d'extraits végétaux sur le développement du diabète de type 2: Physiologie. Education. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT: 2018CLFAS021 . tel-02885485

HAL Id: tel-02885485

<https://theses.hal.science/tel-02885485>

Submitted on 30 Jun 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.

ECOLE DOCTORALE

Des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement
Clermont-Ferrand

Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Discipline : Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives.

Présentée par :

Vivien CHAVANELLE

EFFETS DE DEUX MODALITES D'ENTRAINEMENT ET D'UNE COMPLEMENTATION A BASE D'EXTRAITS VEGETAUX SUR LE DEVELOPPEMENT DU DIABETE DE TYPE 2

Soutenue le : 18 Juin 2018

Jury :

Pr Nathalie BOISSEAU (PU)	UFR STAPS, Université Clermont-Auvergne (Directrice de thèse)
Dr Sébastien PELTIER (HDR)	Valbiotis, La Rochelle (Directeur de thèse)
Pr Irène MARGARITIS (PU)	Détachée de l'Université Nice Sophia-Antipolis à l'ANSES, Paris (Rapporteuse)
Dr Frédéric DAUSSIN (MCF-HDR)	UFR STAPS, Université Lille 2 (Rapporteur)
Dr Lydie COMBARET (DR)	INRA Auvergne-Rhône-Alpes, Theix (Examinatrice)
Pr Thierry MAUGARD (PU)	LIENSS, Université de La Rochelle (Examineur)
Membre invité :	
Dr Pascal SIRVENT (MCF-HDR)	Valbiotis, La Rochelle et UFR STAPS, Université Clermont-Auvergne (Co-encadrant)

1. REMERCIEMENTS

A mes directeurs de thèse, le Pr Nathalie Boisseau et le Dr Sébastien Peltier

Nathalie, Sébastien, je suis immensément honoré de la confiance que vous m'avez accordée pendant ces années. Au-delà de vos compétences professionnelles qui ne sont plus à démontrer, ce sont vos qualités humaines exceptionnelles qui ont fait de ces 3 années un passage de ma vie inoubliable.

Aux membres du Jury, le Pr Irène Margaritis, le Pr Thierry Maugard, le Dr Frédéric Daussin et le Dr Lydie Combaret

Je suis très honoré de vous compter parmi les membres de mon jury. Un immense merci pour votre temps, que je sais précieux. Un grand merci également pour votre expertise apportée sur mon travail qui, je l'espère, vous apportera satisfaction.

A mon co-encadrant, le Dr Pascal "La Sirve" Sirvent

Merci pour votre soutien et tous les efforts produits pour me conduire là où je me trouve aujourd'hui. Difficile de retracer exhaustivement ici en seulement quelques lignes tout ce que vous avez fait pour moi depuis mon arrivée au laboratoire AME2P en 2011 (!!!). Quelques moments marquants tout de même : Merci de m'avoir hébergé chez vous, à mon arrivée à Clermont-Ferrand. Merci de m'avoir porté jusqu'à l'obtention de mon master. Merci de m'avoir soutenu jusqu'à l'inscription en doctorat et accompagné à travers celui-ci. Enfin, merci de m'avoir mené jusqu'à ce nouveau poste, 7 ans plus tard, au sein de la société Valbiotis, que je suis très fier d'intégrer sous votre responsabilité. Un véritable Bon Samaritain des campus universitaires ! Je suis bien conscient de vous devoir beaucoup (par ailleurs je ne suis pas le seul dans ce cas-là) et j'espère avoir honoré la confiance que vous m'avez accordée pendant toutes ces années. Je garde un souvenir ému de tous ces bons moments passés ensemble, au labo ou en congrès, fussent-ils autour d'un résultat de western-blot ou d'une bonne IPA !

Aux anciens doctorants, nouveaux papas et éternels amis, les docteurs Gaël "Joël" "H-cup" "Quinquin" Ennequin et Kévin "Docteur Kéké" Caillaud

Ces quelques lignes ne comblent pas le vide que vous avez laissé ici à la suite de votre départ, mais elles permettront de ramener à la surface, je l'espère, une partie des innombrables souvenirs que nous partageons ensemble. C'est une fierté immense de vous compter parmi les personnes sur qui je compte, justement. C'est une grande joie de voir ces liens, forgés il y a maintenant une poignée d'années, résister à l'épreuve du temps. Merci pour tout (et surtout merci de m'avoir laissé une copie de vos manuscrits en pdf, sources d'inspiration intarissables auxquelles ce présent manuscrit doit beaucoup).

Aux chercheurs et au personnel de l'INRA de Theix

Julien, Philippe, Christophe (x2), Mehdi, Arlette, Yoann, Isabelle, Dominique, et bien sûr Basile, merci pour votre accueil chaleureux à l'occasion de nos fréquentes visites chez vous, merci pour vos conseils judicieux et votre aide précieuse lors de nos expérimentations chez vous.

Au reste du laboratoire AME2P

Dans un laboratoire de recherche, les gens viennent et passent au gré des contrats, diplômes, stages... Des liens se font et se défont. On se croise, ou pas. Impossible de nommer ici toutes personnes que j'ai croisées pendant ces 7 années, mais je souhaite néanmoins citer ici quelques-unes des personnalités marquantes de cette équipe hors du commun, au risque d'en oublier certaines (à celles-là, je présente mes excuses).

A Julien "Pouley" Verney : Merci pour ton claquage à la cuisse pendant les quelques sprints qui nous étaient imposés pour le bien d'une manip'. J'y repense souvent dans les moments vraiment difficiles. Blague à part, une bonne partie de l'ambiance joyeuse qui règne au laboratoire t'est directement accréditée. Merci aussi pour ces sessions de volley à l'heure où les gens normaux mangent. Je garde donc de toi, cher Pouley, le souvenir d'un athlète accompli, mais aussi avant tout, celui d'un homme d'équilibre. Un homme qui saurait par exemple, si le besoin s'en faisait ressentir, compenser la finesse de sa silhouette par un humour un poil grassouillet. Ou *vice-versa*.

A Monique "Momo" Etienne, ma seconde maman au laboratoire, mais qu'on ne s'y trompe pas : des deux, le vieux dinosaure de ces murs, c'est bien moi. Merci d'avoir ajouté à mon vocabulaire toutes ces expressions tantôt désuètes, tantôt obsolètes, qui contrastent vivement avec tes compétences qui elles, ne le sont pas.

A Allison "Allisã" Teixeira, merci pour ta rigueur sur ton travail au labo et aussi pour tes merveilleux gâteaux. Merci aussi d'accepter régulièrement de peler mes mandarines, m'épargnant ainsi une mort certaine par choc anaphylactique (VRAI !).

A Geoffrey "Cucuf" Delcros :

*Mon technicien de labo
Il fait du Viet-Vo-Dao
T'ouvres ta gueule il t'met K.O.
D'avant ta meuf ah ! C'est ballot.*

*Plus beau gosse qu'Etienne Daho
Plus classe que Manu Chao
Son nom c'est Geoffrey Delcros
Mon technicien de labo*

A Virginie "Vivi" Kluka et Elodie "Chapelure" Chapelais, votre chemin vous éloigne du labo, mais c'est toujours un plaisir de vous retrouver. Ces années partagées ensemble étaient tellement heureuses, pourvu que ça dure ! (PS : Vivi, je te pardonne de m'avoir appelé "simple" dans les remerciements de ta propre thèse. Elo, je te pardonne tes choix musicaux dans la voiture lors de notre virée à Pénestin).

A Florie Maillard, Maxime "L'Archiviste" Bargetto, Yolanda "Tata Yoyo" Otero, Mélina Bailly, Vincent Martin et David "Titi" Thivel, merci pour votre sympathie, votre bonne humeur et merci pour les bons moments passés au labo, en congrès ou en soirée. Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

A Enzo "Zozo" Piponnier et son épouse l'inénarrable Livia "Liviol" Garry, merci pour ces soirées joyeuses et bruyantes autour d'un jeu de cartes et de quelques bières qui ont ponctué nos semaines depuis votre arrivée à Clermont-Ferrand. Merci pour votre bonne humeur lors de nos sorties en montagne, les rares fois où le Massif Central daigne offrir des conditions hivernales de bon acabit. Le nouvel an passé chez vous à Samoëns reste quant à lui inoubliable ! Puis-je vous suggérer cependant de reprendre peut-être 1 ou 2 leçons à l'ESF dans le but d'être enfin capables de dompter les pentes du Sancy ou du Lioran sans gâcher nos sessions avec vos blessures à répétitions ?

A Pauline "Popo" Genin et Maud "La Girafe", mes colocataires de bureau : merci d'avoir enchanté l'ambiance de cette petite pièce, certes bruyante, mais surtout vivante ! Je vous suis extrêmement reconnaissant d'avoir banni « moins pire » de votre vocabulaire et d'avoir permis à toutes ces années de s'écouler sans heurts, malgré la promiscuité. Ne changez rien les filles et surtout n'oubliez pas de commencer à écrire votre thèse ! Popo, j'attends toujours que tu acceptes un jour de boire une bière avec nous...

A Lore "Lorette" Metz, merci pour de m'avoir accordé ta confiance pour l'encadrement des TP d'informatique-bureautique de tes "petits DEUST", j'ai beaucoup appris à leur contact, et j'ai adoré ces heures d'enseignement que tu m'as confiées.

A Antoine "Sourdille" Sourdrille, désolé d'avoir refusé de prononcer proprement ton nom pendant tout ce temps. Prenons ça comme des repréailles légitimes faisant suite à la sonnerie de mon réveil que tu avais programmée à 3h du mat', un beau mardi, et dont la surprise était à deux doigts de déclencher un infarctus dans mes pauvres artères déjà obstruées par le sel que tu avais versé dans mon eau, dans une sournoise tentative de lent empoisonnement. Et aussi pour toutes les fois où tu parles alors que tu devrais la mettre en *sourdrine*. Heu, en sourdine. Peace man, et bon vent à toi.

Enfin, merci aux nombreux stagiaires pour votre aide précieuse sur les manips de près ou de loin. Un grand merci notamment Lucas "Justin" Bascoulegue pour ton application et ton sérieux, et bien sûr pour les gâteaux !

Aux nouveaux arrivants Valbiotis :

Merci à tous de votre soutien et de contribuer à prolonger l'excellente ambiance de travail qui domine ici entre nous, d'Aubière vers Riom !

A Ma Belle, Agnès, "Ingrid", "Svetlana", "S.", ... :

Les mots me manquent et la pudeur m'empêche d'exprimer ici la reconnaissance que tu mériterais. Pour s'en tenir à l'aspect purement "thèse", qui ne représente pourtant qu'une fraction ridicule, presque insultante, de l'importance que tu as dans ma vie, je te dis merci. Merci pour ton soutien continu et inconditionnel dans les bons moments comme dans ceux plus difficiles. Merci pour ta capacité exceptionnelle à gérer ton propre stress, qui rend la vie à tes côtés la plus douce et la plus paisible qu'il soit. J'espère faire aussi bien quand ce sera à mon tour d'être là pour toi, et ce sera un véritable challenge tant la barre est haute ! Pour le reste, le meilleur est, j'en suis sûr, devant nous... Si tant est qu'il soit possible de rendre quoi que ce soit entre nous encore meilleur !

Sans oublier :

A mon entourage au quotidien, de près ou de loin, avec ou sans lien direct avec la rédaction de ce manuscrit ; à ma famille : Cathy, Yves, Célia, Julien et Alizée (bienvenue !), à mes amis ; à la musique, à la neige, au vent, aux vagues ; au café, aux spécialités houblonnées et autres béquilles chimiques : merci de rendre mon passage dans ce monde supportable.

[...]

*It matters not how strait the gate,
How charged with punishments the scroll,
I am the master of my fate:
I am the captain of my soul.*

William Ernest Henley, 1888

2. SOMMAIRE

2.1. TABLE DES MATIERES

1. REMERCIEMENTS	1
2. SOMMAIRE	7
2.1. TABLE DES MATIERES	8
2.2. PUBLICATIONS.....	11
2.2.1. <i>Publications directement associées aux travaux de thèse</i>	11
2.2.2. <i>Autres publications</i>	11
2.3. COMMUNICATIONS ORALES OU AFFICHEES	13
2.3.1. <i>Communications orales ou affichées directement associées aux travaux de thèse</i>	13
2.3.1. <i>Autres communications orales ou affichées</i>	13
2.4. BREVETS	14
2.5. LISTE DES FIGURES	15
2.6. LISTE DES TABLEAUX	17
2.7. LISTE DES ABREVIATIONS	18
3. INTRODUCTION GENERALE	19
3.1. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES DU DIABETE	20
3.2. LE DIABETE DE TYPE 2 : EVOLUTION ET PRISE EN CHARGE.....	22
3.2.1. <i>Evolution du diabète de type 2</i>	22
3.2.2. <i>Le prédiabète, un stade clef de la prise en charge</i>	24
3.2.3. <i>La place de la recherche et de l'innovation dans les thérapies hygiéno-diététiques</i>	25
3.3. OBJECTIFS DU PROJET	26
4. REVUE DE LITTERATURE	28
4.1. PHYSIOPATHOLOGIE DU DIABETE DE TYPE 2.....	29
4.1.1. <i>Introduction</i>	29
4.1.2. <i>Signalisation insulinique</i>	29
4.1.3. <i>Tissu adipeux blanc</i>	31
4.1.4. <i>Cellules bêta du pancréas</i>	33
4.1.5. <i>Muscle squelettique</i>	36
4.1.6. <i>Foie</i>	40
4.1.7. <i>Implications des autres organes</i>	42
4.1.8. <i>Conclusion</i>	44
4.2. TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES.....	46
4.2.1. <i>Classes de médicaments et mécanismes d'action</i>	46
4.2.2. <i>Recommandations thérapeutiques</i>	52
4.2.3. <i>Limites et effets indésirables</i>	54
4.3. L'ACTIVITE PHYSIQUE	56
4.3.1. <i>Introduction</i>	56
4.3.2. <i>Intérêt des modalités de type aérobie dans la prise en charge du DT2 : MICT et HIIT</i>	58
4.3.3. <i>Interactions avec la metformine</i>	64
4.3.4. <i>Conclusion</i>	65
4.4. COMPLEMENTS NUTRITIONNELS	66

4.4.1.	<i>Introduction</i>	66
4.4.2.	<i>Artichaut</i>	67
4.4.3.	<i>Camomille d'or</i>	69
4.4.4.	<i>Myrtille</i>	71
4.4.5.	<i>Feuilles d'olivier</i>	74
4.4.6.	<i>Poivre noir</i>	76
4.4.7.	<i>Actions potentielles de Totum-63</i>	79
5.	OBJECTIFS ET HYPOTHESES DE TRAVAIL	82
6.	MATERIEL ET METHODES	84
6.1.	ANIMAUX.....	85
6.1.1.	<i>Souris BKS(D)-Leprdb/JOrIRj (db/db)</i>	85
6.1.2.	<i>Souris C57BL/6 nourrie avec un régime riche en graisse</i>	85
6.1.3.	<i>Régimes</i>	86
6.2.	PROCEDURES IN VIVO.....	87
6.2.1.	<i>Prise alimentaire, poids et composition corporelle</i>	87
6.2.2.	<i>Estimation de la dépense énergétique par calorimétrie indirecte</i>	87
6.2.3.	<i>Estimation de l'efficacité apparente d'absorption énergétique</i>	87
6.2.4.	<i>Mesure de la glycémie</i>	88
6.2.5.	<i>Test de tolérance intrapéritonéal à l'insuline (ITT)</i>	88
6.2.6.	<i>Test oral de tolérance aux glucides (OGTT)</i>	88
6.3.	PROCEDURES EX VIVO.....	89
6.3.1.	<i>Incubation de muscles</i>	89
6.3.2.	<i>Respiration mitochondriale haute résolution sur fibres perméabilisées</i>	89
6.4.	DOSAGES BIOCHIMIQUES.....	93
6.4.1.	<i>Quantification du niveau d'abondance des protéines par western Blot</i>	93
6.4.2.	<i>Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR</i>	96
6.4.3.	<i>Activités enzymatiques</i>	98
6.4.4.	<i>Dosages colorimétriques</i>	101
6.5.	STATISTIQUES.....	105
7.	ETUDE 1 : EFFETS DE DEUX PROGRAMMES D'ENTRAINEMENT SUR LE CONTROLE GLYCEMIQUE ET LA FONCTION MITOCHONDRIALE DU MUSCLE SQUELETTIQUE DE JEUNES SOURIS DB/DB	106
7.1.	PREAMBULE.....	107
7.2.	INTRODUCTION.....	108
7.3.	MATERIEL ET METHODES.....	110
7.3.1.	<i>Animaux</i>	110
7.3.2.	<i>Procédures in vivo</i>	111
7.3.3.	<i>Collecte du sang et paramètres sériques</i>	111
7.3.4.	<i>Incubations de muscles</i>	111
7.3.5.	<i>Activités enzymatiques</i>	111
7.3.6.	<i>Respiration mitochondriale sur fibres perméabilisées</i>	112
7.3.7.	<i>Western-Blot</i>	112
7.3.8.	<i>Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR</i>	112
7.3.9.	<i>Analyse statistique</i>	112
7.4.	RESULTATS.....	114
7.4.1.	<i>Composition corporelle</i>	114
7.4.2.	<i>Glycémie et réponse aux tests de tolérance à l'amidon et à l'insuline</i>	114
7.4.3.	<i>Métabolisme oxydatif musculosquelettique</i>	115
7.4.4.	<i>Voie de signalisation de l'insuline et contenu en Glut4 dans le muscle squelettique</i>	117

7.5.	DISCUSSION.....	119
8.	ETUDE 2 : EFFET DE TOTUM-63 SUR LE DEVELOPPEMENT DU DT2 DE JEUNES SOURIS DB/DB ET DE JEUNES SOURIS NOURRIES AVEC UN REGIME RICHE EN GRAISSE	124
8.1.	INTRODUCTION GENERALE	125
8.2.	ETUDE 2A : SOURIS DB/DB	128
8.2.1.	<i>Contexte</i>	128
8.2.2.	<i>Méthode</i>	128
8.2.3.	<i>Résultats</i>	132
8.2.4.	<i>Discussion</i>	137
8.3.	ETUDE 2B : SOURIS HF	141
8.3.1.	<i>Contexte</i>	141
8.3.2.	<i>Méthodes</i>	142
8.3.3.	<i>Résultats Expérimentation HF-16S</i>	146
8.3.4.	<i>Résultats expérimentation HF-4S</i>	153
8.3.5.	<i>Résultats expérimentation HF-ON/OFF</i>	156
8.3.6.	<i>Discussion</i>	162
8.4.	CONCLUSION GENERALE DE L'ETUDE 2	169
9.	DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	171
10.	REFERENCES.....	187
11.	ANNEXES.....	211
11.1.	STATISTIQUES COMPLETES ETUDE 2A FIGURE 19.....	212
11.2.	STATISTIQUES COMPLETES ETUDE 2B FIGURE 35	214
11.3.	DOSAGES DE PROTEINES TOTALES FIGURE 30	217
11.4.	ARTICLE ORIGINAL PARU DANS SCIENTIFIC REPORTS.....	218

2.2. PUBLICATIONS

2.2.1. Publications directement associées aux travaux de thèse

Chavanelle, V., N. Boisseau, Y.F. Otero, L. Combaret, D. Dardevet, C. Montaurier, G. Delcros, S.L. Peltier, and P. Sirvent, *Effects of high-intensity interval training and moderate-intensity continuous training on glycaemic control and skeletal muscle mitochondrial function in db/db mice*. Sci Rep, 2017. 7(1): p. 204 (IF 2017 : 4,259).

Chavanelle, V., P. Sirvent, G. Ennequin, K. Caillaud, C. Montaurier, B. Morio, N. Boisseau, and R. Richard, *Comparison of oxygen consumption in rats during uphill (concentric) and downhill (eccentric) treadmill exercise tests*. J Sports Sci Med, 2014. 13(3): p. 689-94 (IF 2017 : 1,797).

2.2.2. Autres publications

Ennequin, G., F. Capel, K. Caillaud, **V. Chavanelle**, M. Etienne, A. Teixeira, X. Li, N. Boisseau, and P. Sirvent, *Neuregulin 1 improves complex 2-mediated mitochondrial respiration in skeletal muscle of healthy and diabetic mice*. Sci Rep, 2017. 7(1): p. 1742 (IF 2017 : 4,259).

Verney, J., V. Martin, S. Ratel, **V. Chavanelle**, M. Bargetto, M. Etienne, E. Chaplais, P. Le Ruyet, C. Bonhomme, L. Combaret, C. Guillet, N. Boisseau, P. Sirvent, and D. Dardevet, *Soluble Milk Proteins Improve Muscle Mass Recovery after Immobilization-Induced Muscle Atrophy in Old Rats but Do not Improve Muscle Functional Property Restoration*. J Nutr Health Aging, 2017. 21(10): p. 1133-1141 (IF 2017 : 2,772).

Caillaud, K., N. Boisseau, G. Ennequin, **V. Chavanelle**, M. Etienne, X. Li, P. Denis, D. Dardevet, A. Lacampagne, and P. Sirvent, *Neuregulin 1 improves glucose tolerance in adult and old rats*. Diabetes Metab, 2016. 42(2): p. 96-104 (IF 2017 : 2,772).

Ennequin, G., N. Boisseau, K. Caillaud, **V. Chavanelle**, M. Etienne, X. Li, C. Montaurier, and P. Sirvent, *Neuregulin 1 affects leptin levels, food intake and weight gain in normal-weight, but not obese, db/db mice*. Diabetes Metab, 2015. 41(2): p. 168-72 (IF 2017 : 4,101).

Ennequin, G., N. Boisseau, K. Caillaud, **V. Chavanelle**, M. Etienne, X. Li, and P. Sirvent, *Neuregulin 1 Improves Glucose Tolerance in db/db Mice*. PLoS One, 2015. 10(7): p. e0130568 (IF 2017 : 2,806).

Ennequin, G., N. Boisseau, K. Caillaud, **V. Chavanelle**, M. Gerbaix, L. Metz, M. Etienne, S. Walrand, A. Masgrau, C. Guillet, D. Courteix, A. Niu, Y.P. Li, F. Capel, and P. Sirvent, *Exercise training and return to a well-balanced diet activate the neuregulin 1/ErbB pathway in skeletal muscle of obese rats*. J Physiol, 2015. 593(12): p. 2665-77. (IF 2017 : 4,739)

2.3. COMMUNICATIONS ORALES OU AFFICHEES

2.3.1. *Communications orales ou affichées directement associées aux travaux de thèse*

Chavanelle V., F. Maillard, Y.F. Otero, G. Delcros, A. Sourdrille, S.L. Peltier, N. Boisseau & P. Sirvent, *Effet de l'entraînement intermittent à haute intensité sur le contrôle glycémique et la fonction mitochondriale dans un contexte d'insulinorésistance chez le rongeur.* Communication orale. Congrès ACAPS 2017, Dijon (France)

Chavanelle V., Y.F. Otero, F. Le Joubioux, T. Maugard, N. Boisseau, P. Sirvent and S. Peltier, *Totum-63 (principe actif du Valedia®) améliore la sensibilité à l'insuline et limite la prise de masse grasse chez la souris nourrie avec un régime riche en graisses.* Communication affichée, congrès SFD 2017, Lille (France).

Chavanelle V., N. Boisseau, F. Maillard, L. Combaret, D. Dardevet, C. Montaurier, P. Denis, L. Metz, S. Peltier and P. Sirvent, *High intensity interval training improves glucose metabolism in diabetic mice despite the absence of mitochondrial adaptations.* Communication orale, ECSS Congress 2016, Vienna (Autriche).

Chavanelle V., F. Le Joubioux, T. Maugard, N. Boisseau, P. Sirvent, and S. L. Peltier, *A new botanical complex improves blood glycemic control and reduces hepatic steatosis in mice.* Communication affichée, Congrès ADA 2016, New Orleans (Etats-Unis).

Chavanelle V., F. Le Joubioux, T. Maugard, N. Boisseau, P. Sirvent and S. Peltier, *Valedia, un nouveau candidat régulateur de l'AMPK pour la prévention du diabète de type 2.* Communication affichée, congrès SFD 2016, Lyon (France).

Sirvent P.1, **V. Chavanelle**, G. Ennequin, K. Caillaud, C. Montaurier, B. Morio, N. Boisseau and R. Richard, *Comparison of oxygen consumption in rats during uphill (concentric) and downhill (eccentric) treadmill exercise tests.* Communication orale, ECSS Congress 2013, Barcelona (Espagne).

2.3.1. *Autres communications orales ou affichées*

Ennequin, G., N. Boisseau, K. Caillaud, **V. Chavanelle**, M. Gerbaix, L. Metz, M. Etienne, S. Walrand, A. Masgrau, C. Guillet, D. Courteix, A. Niu, Y.P. Li, F. Capel, and P. Sirvent, *Exercise training activates Nrg1/ErbB pathway in gastrocnemius of obese rats.* Communication orale, ECSS Congress 2015, Malmö (Suède).

2.4. BREVETS

Peltier S., **V. Chavanelle** and P. Sirvent, *Composition comprenant un mélange de molécules extraites de chrysanthellum indicum et de cynara scolymus et utilisation pour agir sur le métabolisme glucidique et/ou lipidique*. Brevet FR1559965.

Peltier S., **V. Chavanelle**, F. Le Joubioux, P. Sirvent and T. Maugard, *Principe actif pharmaceutique et utilisation en particulier dans la prévention et le traitement des dérèglements métaboliques chez l'homme et l'animal*. Brevet FR1770144

2.5. LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : EVOLUTION DU NOMBRE DE DIABETIQUES (CHIFFRES IDF 2015)	20
FIGURE 2 : VOIE DE SIGNALISATION FONCTIONNELLE DE L'INSULINE (SCHEMA SIMPLIFIE)	30
FIGURE 3 : ROLE CENTRAL DU TISSU ADIPEUX DANS LE DEVELOPPEMENT DE L'INSULINORESISTANCE (CUSI, K. 2010)	32
FIGURE 4 : MITOCHONDRIE ET RESISTANCE A L'INSULINE (MONTGOMERY, M. K. ET TURNER, N. 2015)	39
FIGURE 5 : <i>THE OMINOUS OCTET</i> (MODIFIE D'APRES DEFRONZO, R. A. 2009)	45
FIGURE 6 : CIBLES DES DIFFERENTES CLASSES DE MEDICAMENTS (MODIFIE D'APRES DEFRONZO, R. A. 2009)	51
FIGURE 7 : RECOMMANDATIONS DE LA HAS SUR LES STRATEGIES MEDICAMENTEUSES POUR LA PRISE EN CHARGE DU DT2	53
FIGURE 8 : COMPLIANCE AUX RECOMMANDATIONS D'ACTIVITE PHYSIQUE (KING, A. C. ET AL. 1995)	63
FIGURE 9 : UN CHAMP D'ARTICHAUTS (<i>CYNARA SCOLYMUS</i>)	67
FIGURE 10 : CAMOMILLE D'OR (<i>CHRYSANTHELLUM INDICUM</i>)	69
FIGURE 11 : MYRTILLE (<i>VACCINIUM MYRTILLUS</i>)	71
FIGURE 12 : FEUILLES D'OLIVIER (<i>OLEA EUROPAEA</i>)	74
FIGURE 13 : LIANE DE POIVRE NOIR (<i>PIPER NIGRUM</i>)	76
FIGURE 14 : PRINCIPAUX COMPOSES PHYTOCHIMIQUES ET EFFETS ATTENDUS DE TOTUM-63 DANS UN CONTEXTE DE DT2	80
FIGURE 15 : DESIGN DE L'ETUDE 1	113
FIGURE 16 : GLYCEMIE, INSULINEMIE, OGTT ET ITT	115
FIGURE 17 : METABOLISME OXYDATIF MUSCULOSQUELETTIQUE	116
FIGURE 18 : RESPIROMETRIE ET ACTIVITES ENZYMATIQUES	117
FIGURE 19 : VOIE DE SIGNALISATION DE L'INSULINE ET GLUT4	118
FIGURE 20 : SCHEMA CHRONOLOGIQUE DES EXPERIMENTATIONS DE L'ETUDE 2	127
FIGURE 21 : DESIGN DE L'ETUDE 2A	131
FIGURE 22 : ETUDE 2A - PRISE ALIMENTAIRE ET COMPOSITION CORPORELLE	133
FIGURE 23 : ETUDE 2A – CONTROLE GLYCEMIQUE	135
FIGURE 24 : ETUDE 2A – TRIGLYCERIDES HEPATIQUES ET PLASMATIQUES	136
FIGURE 25 : ETUDE 2A – VOIE DE SIGNALISATION DE L'INSULINE	137
FIGURE 26 : DESIGN DE L'ETUDE 2B	146
FIGURE 27 : ETUDE 2B – HF-16S. PRISE ALIMENTAIRE, COMPOSITION CORPORELLE ET CONTROLE GLYCEMIQUE.	148
FIGURE 28 : ETUDE 2B – HF-16S. TRIGLYCERIDES HEPATIQUES ET PLASMATIQUES ET AGNE.	149
FIGURE 29 : ETUDE 2B – HF-16S. REPONSE AUX ITT ET OGTT.	150
FIGURE 30 : ETUDE 2B – HF16S. VOIE DE SIGNALISATION DE L'INSULINE (FOIE ET GASTROCNEMIEN)	151
FIGURE 31 : ETUDE 2B – HF16S. VOIE DE SIGNALISATION DE L'INSULINE (SOLEAIRE ET TISSU ADIPEUX INGUINAL)	152
FIGURE 32 : ETUDE 2B – HF-4S. PRISE ENERGETIQUE, MASSE, GLYCEMIE ET INSULINEMIE.	154
FIGURE 33 : ETUDE 2B – HF-4S. MESURE DE LA DEPENSE ENERGETIQUE ET ESTIMATION DE L'EAAE.	156
FIGURE 34 : ETUDE 2B – HF-ON/OFF. EVOLUTION DE LA MASSE, MASSE GRASSE, GLYCEMIE ET INSULINEMIE	160
FIGURE 35 : ETUDE 2B – HF-ON/OFF. EFFET DE 3 SEMAINES D'ARRET PUIS DE REPRISE DE LA SUPPLEMENTATION AVEC T63.	162

FIGURE 36 : ORGANES CIBLES DE TOTUM-63 (MODIFIE D'APRES DE FRONZO R.A. 2009).	177
FIGURE 37 : MECANISMES D'ACTION DE TOTUM-63.....	180
FIGURE 38 : DOSAGE DE PROTEINES TOTALES POUR WB, COMPLEMENT FIGURE 30.....	217

2.6. LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : COMPOSITION DES REGIMES	86
TABLEAU 2 : COMPOSITION DU TAMPON KREBS-HENSELHEIT	89
TABLEAU 3 : COMPOSITION DU MILIEU DE CONSERVATION BIOPS	90
TABLEAU 4 : COMPOSITION DU MILIEU DE RESPIRATION MIRO5	90
TABLEAU 5 : REACTIFS	91
TABLEAU 6 : ANTICORPS ET SPECIFICITES METHODOLOGIQUES.....	95
TABLEAU 7 : COMPOSITION DU MASTER MIX DE RETROTRANSCRIPTION	97
TABLEAU 8 : COMPOSITION DU MIX POUR LA REACTION EN CHAINE PAR POLYMERASE	98
TABLEAU 9 : SONDAS TAQMAN UTILISEES.....	98
TABLEAU 10 : TAMPON DE REACTION ENZYMATIQUE CS	99
TABLEAU 11 : TAMPON DE REACTION ENZYMATIQUE B-HAD	100
TABLEAU 12 : CARACTERISTIQUES DES SOURIS AVANT ET APRES ENTRAINEMENT	114
TABLEAU 13 : ANOVA A 3 VOIES (FIG. 19).....	212
TABLEAU 14 : TEST POST-HOC SNK - EFFET EXERCICE (FIG. 19).....	212
TABLEAU 15 : POST HOC SNK - EFFET INSULINE*EXERCICE (FIG.19)	213
TABLEAU 16 : ANOVA A MESURES REPETEES SUR PRISE ALIMENTAIRE (FIG. 32)	214
TABLEAU 17 : POST-HOC TUKEY SUR PRISE ALIMENTAIRE (FIG. 32)	214
TABLEAU 18 : ANOVA A MESURES REPETEES SUR GAIN DE MASSE (FIG. 32)	215
TABLEAU 19 : POST-HOC TUKEY SUR GAIN DE MASSE (FIG. 32)	215
TABLEAU 20 : ANOVA A MESURES REPETEES SUR GAIN DE MASSE GRASSE	216
TABLEAU 21 : POST-HOC DE TUKEY SUR GAIN DE MASSE GRASSE	216

2.7. LISTE DES ABREVIATIONS

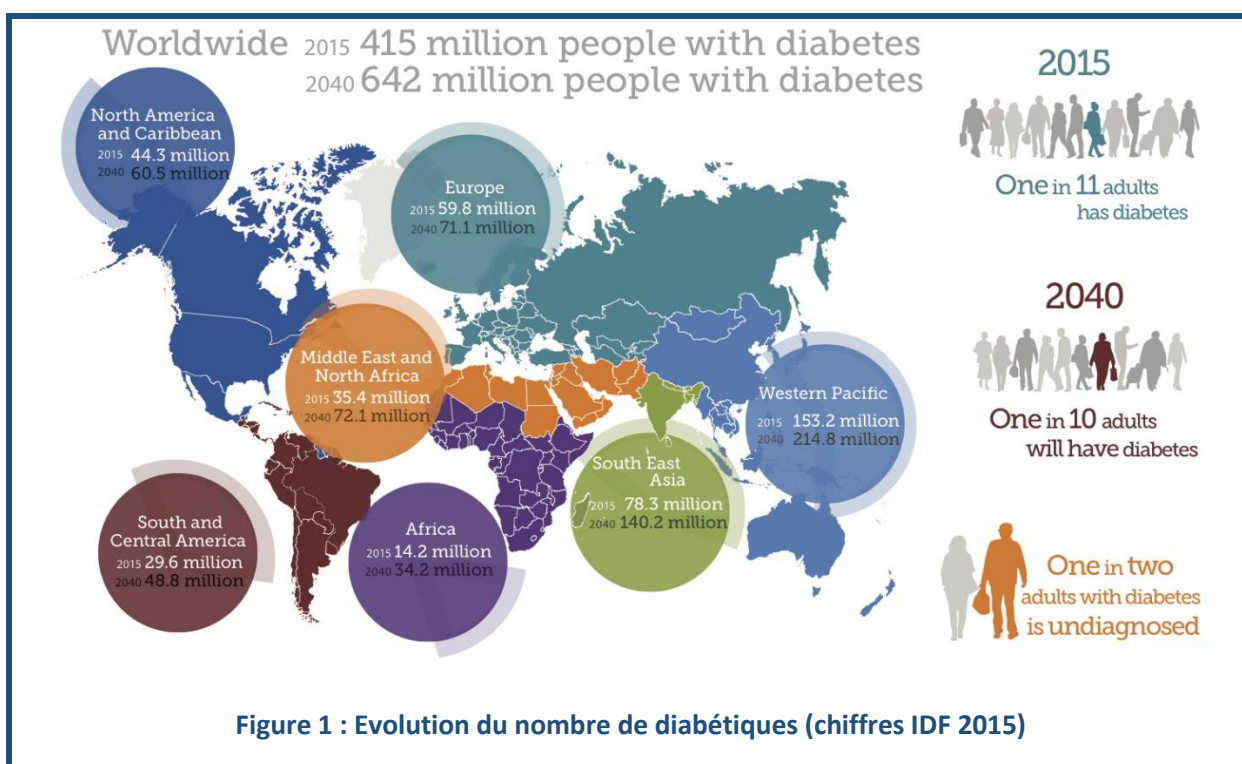
ACSM : *American College of Sports Medicine*
ADA : *American Diabetes Association*
ADP : Adénosine Diphosphate
AFFSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
AGL : Acides Gras Libres
AGNE : Acides Gras Non Estérifiés
Akt : Protéine kinase sérine/thréonine alpha (ou protéine kinase B)
AMPK : Protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate
ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARNm : Acide Ribonucléique messager
AS160 : Substrat d'Akt de 160 kDa (ou TBC1D4).
ASB : albumine de sérum bovin
ATP : Adénosine Triphosphate
 β -HAD : beta-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
Ca²⁺ : Ion calcium
CAT : Catalase
CCCP : Carbonyl cyanide m-chloro phenyl hydrazine
CER : Céréamides
CIFRE : Conventions Industrielles de Formation par la Recherche
CO₂ : Dioxyde de carbone
CON : Contrôle
CS : Citrate Synthase
CTE : Chaîne de Transport d'Electrons
DAG : Diacylglycérol
DPP-IV : Dipeptidyl Peptidase-4
DT2 : Diabète de Type 2
DTT : Dithiothreitol
EAAE : Efficacité Apparente d'Absorption Energétique
EASD : *European Association for the Study of Diabetes*
EFSA : *European Food Safety Authority*
ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinase ½
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
FoxO1 : Protéine Forkhead Box O1
GIP : peptide insulinothépe dépendant du glucose
GLP-1 : glucagon-like peptide-1
Glut : Transporteurs du Glucose
GPx : Glutathione peroxidase
GSK-3 : Glycogen Synthase Kinase-3
HAS : Haute Autorité de Santé
HbA1c : Hémoglobine glyquée
HF : Régime riche en graisse
HIIT : Entrainement Intermittent à Haute Intensité

HMGCoA réductase : 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase
HOMA-IR : Modèle d'évaluation homéostatique de la résistance à l'insuline
IMC : Indice de Masse Corporelle
INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
IRS1 : Substrat 1 du récepteur à l'insuline.
ITT : Test de Tolérance à l'insuline
JNK : Kinase c-Jun N-terminal
K⁺ : Ion potassium
kDa : kilodalton
MES : Acide 4-Morpholineethanesulfonique
MICT : Entrainement Continu à Intensité Modéré
mTor : *mammalian Target of rapamycin* (cible de la rapamycine chez les mammifères)
NS : Non-significatif
O₂ : Oxygène
OGTT : Test de Tolérance aux Glucides
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OXPHOS : Phosphorylation Oxydative
PDE : Phosphodiesterase
PEPCK : Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PGC1- α : Coactivateur 1-alpha du récepteur gamma activé du proliférateur du peroxyosome.
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2 : Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
PIP3 : Phosphatidylinositol (3,4,5)- trisphosphate
PKC : Protéine Kinase C
PPAR : récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes
RE : Réticulum Endoplasmique
SFD : Société Francophone du Diabète
SGLT : Cotransporteurs glucose sodium dépendant
SOD : Superoxyde dismutase
Souris HF : Souris nourrie avec un régime riche en graisse
TAG : Triacylglycérol ou triglycérides
T-63 : Totum-63
TAing : Tissu adipeux sous-cutané inguinal
u.a. : unités arbitraires
UCP1, UCP2 : *UnCoupling Protein 1 ou 2* (Protéine découplante 1 ou 2)
VCO₂ : Volume de dioxyde de carbone rejeté
 $\dot{V}O_2$: Consommation d'oxygène
 $\dot{V}O_{2max}$: Consommation maximale d'oxygène

3. INTRODUCTION GENERALE

3.1. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES DU DIABETE

Le diabète représente aujourd'hui d'un des principaux défis de santé publique du XXI^e siècle, à l'échelle mondiale. En 2015, 415 millions d'adultes sont diagnostiqués diabétiques. En outre, 318 millions de personnes supplémentaires présentent des signes cliniques de prédiabète, caractérisés par une intolérance au glucose et par un risque très élevé de développer la pathologie dans les années qui suivent. La projection des sociétés savantes pour les années à venir est pessimiste, puisqu'il est estimé qu'en 2040, 642 million d'adultes dans le monde seront diabétiques (IDF 2015), ainsi que l'illustre la Figure 1.



Le diabète de type 2 (DT2) est une forme acquise du diabète qui survient en conséquence d'une prédisposition génétique et/ou de facteurs environnementaux. Il représente 87 à 91% de cas de diabète recensés (Boyle, J. P. *et al.* 1999; Evans, J. M. *et al.* 2000; Bruno, G. *et al.* 2005).

L'accroissement de la prévalence de cette pathologie entraîne évidemment des coûts de plus en plus importants pour les organismes de santé publique. L'estimation à l'échelle de la planète des dépenses de santé liées au traitement du diabète et à ses complications oscille entre 673 milliards et 1 197 milliards de dollars (USD) en 2015, et pourrait s'élever à 1 452 milliards de dollars (USD) en 2040 (IDF 2015).

En France, la situation est tout aussi préoccupante avec plus de 3,7 millions de personnes touchées en 2011 (Fournier, C. *et al.* 2011), 33% des Français considérés comme à risque de développer un DT2 et un coût moyen annuel de près de 6000€ par patient. Ces derniers sont pris en charge à 100% par l'assurance maladie (CNAMTS 2012).

3.2. LE DIABETE DE TYPE 2 : EVOLUTION ET PRISE EN CHARGE

3.2.1. Evolution du diabète de type 2

Le DT2 est une pathologie complexe et évolutive, dont la physiopathologie présente différents stades d'évolution (Knowler, W. C. *et al.* 1995) :

Le premier stade correspond à une phase pré-symptomatique des sujets ayant une susceptibilité génétique. Les individus ne présentent toutefois pas, ou pas encore, de dysfonctionnements métaboliques. Cet héritage génétique délétère est principalement caractérisé par des mutations au niveau de gènes codant pour l'insuline ou son récepteur (Taylor, S. I. *et al.* 1991), de certaines enzymes associées au transport du glucose (Vionnet, N. *et al.* 1992) de protéines associées à la fonction mitochondriale (Dunham-Snary, K. J. et Ballinger, S. W. 2013), d'une prédisposition génétique à l'obésité (Walley, A. J. *et al.* 2006) (cette dernière constituant un facteur de risque indépendant de développer un DT2 (A.D.A. 2017)), ou d'autres mutations ou combinaisons de mutations sur d'autres gènes (Ahlqvist, E. *et al.* 2011).

Le second stade est caractérisé par une intolérance au glucose, une hyperglycémie à jeun, ou les deux, dans des proportions qui ne permettent pas de remplir les critères qui classeraient le patient comme diabétique. Ce stade est aujourd'hui bien reconnu par des sociétés savantes telles que l'*American Diabetes Association*, et nommé prédiabète (A.D.A. 2017), et définit comme un risque accru de développer un diabète de type 2. Il est caractérisé par le diagnostic suivant (E.C.D.C.D.M. 2003; E.C.D.C.D.M. 2003)

- Glycémie à jeun comprise entre 1,00g/l et 1,25 g/l selon les critères de l'*American Diabetes Association* (A.D.A. 2005) ou 1,10 g/l et 1,25 g/l selon les critères de l'Organisation Mondiale pour la Santé.

Ou :

- Intolérance au glucose caractérisée par une glycémie comprise entre 1,40 g/l et 2 g/l deux heures après une charge orale en glucose de 75g.

Ou :

- Hémoglobine glyquée (HbA_{1c}) comprise entre 5,7 et 6,4%.

Ce stade est défini par l'*American Diabetes Association* (ADA) comme un état qui « [...] ne doit pas être vu comme une maladie proprement dite, mais comme un état à risque de diabète ou de maladie cardiovasculaire » (A.D.A. 2017). C'est donc un état à risque, mais non-pathologique et surtout

réversible, grâce à des interventions thérapeutiques qui le ciblent, ainsi que détaillé dans la partie suivante.

Le troisième stade correspond au diabète. Il est caractérisé par une déficience relative en insuline associée à une résistance des tissus aux effets de celle-ci (insulinorésistance) (A.D.A. 2017). Les critères de diagnostic sont les mêmes que pour le prédiabète, avec cependant des seuils plus élevés :

- Glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/l
- Glycémie supérieure à 2 g/l deux heures après une charge orale en glucose de 75g
- Hémoglobine glyquée supérieure à 6,5%

Enfin, le quatrième stade (Knowler, W. C. *et al.* 1995) correspond à l'apparition de complications sont dues à une longue période d'exposition aux symptômes du DT2 dont principalement l'hyperglycémie (Chawla, A. *et al.* 2016). Les principaux organes touchés sont le système cardiovasculaire (risque accru d'athérosclérose, première cause de mortalité chez les patients DT2), les reins (néphropathie augmentant le risque d'insuffisance rénale) et les yeux (rétinopathies pouvant aboutir à la perte de la vue) (Rask-Madsen, C. et King, G. L. 2013).

Durant les différents stades de la pathologie, les recommandations pour la prise en charge du diabète évoluent. Ainsi, la première ligne d'intervention recommandée par les sociétés savantes (consensus entre la principale société Européenne, *European Association for the Study of Diabetes – EASD*, et son homologue outre-Atlantique déjà citée, la ADA) correspond à une modification du mode de vie, c'est-à-dire une action comportementale basée sur une modification du régime alimentaire et une élévation de l'activité physique modérée visant à obtenir une perte de poids d'au moins 5% (7% étant considéré comme optimal) (Inzucchi, S. E. *et al.* 2012; A.D.A. 2016).

Quand les efforts faits sur le mode de vie ne suffisent pas, l'EASD et l'ADA recommandent la prescription de metformine par voie orale, tout en maintenant les recommandations précédentes (Inzucchi, S. E. *et al.* 2015; A.D.A. 2016). Cet antidiabétique de la famille des biguanides a déjà démontré son efficacité sur le contrôle glycémique et sa non-dangerosité à long-terme (Holman, R. R. *et al.* 2008), et est utilisé depuis le milieu du XX^e siècle. Si cette molécule peut être prescrite à une majorité de patients, il existe toutefois des contre-indications, notamment l'insuffisance rénale, mais aussi une infection ou insuffisance cardiaque ou une maladie hépatique chronique. L'utilisation de metformine chez ces patients augmente en effet le risque d'acidose lactique (Sulkin, T. V. *et al.* 1997).

Lorsque les deux lignes d'intervention précédentes ne suffisent plus, plusieurs classes de médicaments, incluant l'insuline, peuvent être combinées. Le coût de la prise en charge et le risque

d'effets indésirables sont proportionnels à l'ajout de nouvelles molécules dans la thérapie (A.D.A. 2016).

3.2.2. Le prédiabète, un stade clef de la prise en charge

Le prédiabète est aujourd'hui clairement identifié et reconnu par les grandes organisations de santé (A.D.A. 2017), et caractérisé par une hyperglycémie à jeun modérée ou une intolérance au glucose modérée (ou les deux, cf. critères cités plus haut, en paragraphe §3.2.1). C'est un état non-pathologique, au diagnostic relativement facile, défini comme à haut risque de développer un DT2 puisque 25% des sujets évoluent vers un diagnostic de DT2 dans les 5 ans (Nathan, D. M. *et al.* 2007). Ce chiffre est même porté à 70% si l'on considère l'évolution pendant toute l'espérance de vie de la personne (Tuso, P. 2014) et au final 100% des patients DT2 ont un jour été prédiabétiques.

C'est également, comme on l'a évoqué plus haut, un stade réversible qui laisse la possibilité de revenir à un stade normo-glycémique asymptomatique (Nathan, D. M. *et al.* 2007). Il représente donc une cible de choix pour les acteurs dont le but est d'enrayer la progression de l'épidémie, d'autant plus que les interventions thérapeutiques s'avèrent très efficaces, pour prévenir l'apparition du DT2 chez ces sujets à risque. Ainsi, dans une méta-analyse récente incluant près de 50000 sujets prédiabétiques, Haw et son équipe montrent une réduction importante du risque relatif d'incidence du DT2 grâce à l'utilisation de médicaments (réduction de 36%) ou la modification du style de vie (changement alimentaire et augmentation de l'activité physique : réduction de 39%). Les auteurs rapportent que l'effet des médicaments est limité dans le temps alors que ceux basés sur les changements d'habitude de vie perdurent (Haw, J. *et al.* 2017). En amont, une étude randomisée sur plus de 3000 sujets prédiabétiques avait d'ailleurs permis de démontrer un effet supérieur des interventions basées sur une amélioration du mode de vie que celui de la metformine (la molécule pharmaceutique de référence pour la prévention et le traitement du DT2) pour réduire le risque d'incidence du DT2 (réduction du risque relatif de 58% pour le mode de vie vs. 31% pour la metformine, vs. placebo) (Knowler, W. C. *et al.* 2002). De plus, dans les faits, la prévalence d'utilisation de la metformine est extrêmement faible parmi les prédiabétiques. Selon des données récentes (Tseng, E. *et al.* 2017), seuls 0,7% de ces derniers utilisent la metformine aux USA. Par ailleurs, la ADA ne recommande l'utilisation de metformine que lorsque des facteurs de risque sont associés aux individus prédiabétiques, à savoir : un IMC supérieur à 35kg/m², un âge supérieur à 60 ans ou pour les femmes, un historique de diabète gestationnel (A.D.A. 2016). De même, en France, l'éventuelle utilisation de cette molécule pour des individus prédiabétiques (donc non-malades) se ferait hors autorisation de mise sur le marché (AMM). Ces éléments fournissent ainsi quelques explications quant à la faible utilisation de la metformine chez la population prédiabétique.

Dans ce cadre, on comprend aisément la place privilégiée qui est accordée aux interventions hygiéno-diététiques comme stratégie thérapeutique du prédiabète, un stade clef pour la prise en charge des « pré-patients ».

3.2.3. La place de la recherche et de l'innovation dans les thérapies hygiéno-diététiques

Le surpoids étant fortement associé au risque de développer un diabète, des études ont montré que la prise en charge de l'obésité était une stratégie efficace pour ralentir ou stopper la progression du prédiabète vers le diabète (Tuomilehto, J. *et al.* 2001; Knowler, W. C. *et al.* 2002). Les sociétés savantes recommandent ainsi une prise en charge hygiéno-diététique, c'est-à-dire une intervention basée sur la modification du mode de vie de la personne. Celle-ci est caractérisée par une baisse modérée des apports énergétiques et une augmentation de la dépense énergétique via un ajout d'activité physique (150 mn d'activité modérée par semaine) en visant une perte de poids de 5 à 7% (A.D.A. 2016). Si ces interventions sont, on l'a vu précédemment, très efficaces, elles pâtissent cependant d'un manque d'adhésion des patients sur le long terme (Mumu, S. J. *et al.* 2014). L'amélioration de la prise en charge des prédiabétiques passe donc par la recherche de méthodes innovantes, à l'efficacité ciblée et offrant la meilleure adhésion possible de la part des individus, notamment dans le champ des modalités d'activité physique, qui constitue l'un des piliers de ces interventions hygiéno-diététiques.

Dans ce cadre, les compléments nutritionnels à base de plantes offrent de nouvelles perspectives de prise en charge en addition au régime nutritionnel et à l'activité physique, toujours en amont de l'approche pharmacologique. En effet, certains végétaux mis en évidence par des travaux ethno-épidémiologiques ont scientifiquement prouvé leur efficacité dans le cadre des pathologies métaboliques (Graf, B. L. *et al.* 2010). Les ingrédients actifs naturellement présents dans les aliments et qui présentent un intérêt pour la santé sont appelés nutraceutiques. Les autorités de santé compétentes dans ce domaine, telles que l'*European Society of Cardiology (ESC)*, reconnaissent d'ailleurs le potentiel de ces nutraceutiques et situent deux axes de travail qui posent l'enjeu de la recherche dans ce domaine, à savoir : s'assurer leur innocuité chez l'être humain et prouver leurs bénéfices sur la santé en mesurant objectivement les effets observés lors d'essais cliniques (Reiner, Z. *et al.* 2011). Ce nouveau champ d'investigation affiche des perspectives prometteuses et offrent un outil de plus à la disposition des praticiens afin de renforcer encore les bénéfices des interventions basées sur une modification du mode de vie, chez les prédiabétiques.

3.3. OBJECTIFS DU PROJET

La progression de l'incidence et donc de la prévalence du DT2, tant au niveau européen que mondial, est préoccupante. Ces chiffres poussent aujourd'hui certains chercheurs à qualifier l'expansion du diabète de « pandémie » (Narayan, K. M. V. *et al.* 2006) et rendent donc fondamental l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques pour freiner le développement de cette maladie.

Comme on l'a vu précédemment, les sociétés savantes préconisent un screening préventif des populations à risque, qui permet un diagnostic précoce du stade de prédiabète, mais qui, s'il est fortement prédictif de l'apparition du DT2, reste réversible.

A ce stade, les interventions basées sur le mode de vie semblent être plus efficaces que le traitement médicamenteux de référence (metformine) (Knowler, W. C. *et al.* 2002; Haw, J. *et al.* 2017). De plus, rappelons que ce dernier est dans les faits plus que sporadiquement utilisé chez les prédiabétiques (Tseng, E. *et al.* 2017).

Dans le but d'améliorer la prise en charge des patients prédiabétiques, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont à l'étude, notamment dans le domaine des activités physiques et dans celui des compléments nutritionnels, qui, associés aux recommandations hygiéno-diététiques, pourraient en potentialiser les bénéfices sans augmenter la charge de contrainte pour le patient. Les connaissances des effets de ces thérapies et des mécanismes explicatifs associés restent à approfondir.

Dans ce cadre, l'objectif général de cette thèse est d'étendre les connaissances concernant les effets et les mécanismes d'action de deux stratégies d'intervention basées sur le mode de vie (l'activité physique et la supplémentation avec un complément nutritionnel) sur la progression du prédiabète vers le DT2.

Le projet s'inscrit dans le cadre d'un contrat de thèse CIFRE (Convention Industrielle de Formation par la Recherche), c'est-à-dire une collaboration entre le laboratoire universitaire des Adaptations Métaboliques à l'Exercice en condition Physiologique et Pathologique (AME2P, Clermont-Ferrand), et la société Valbiotis, une plateforme de recherche et développement impliquée dans l'innovation scientifique pour la prévention et la lutte des maladies métaboliques (La Rochelle).

La première partie de ce manuscrit sera consacrée à une revue de la littérature scientifique. Celle-ci s'attachera dans un premier temps à faire le point sur les connaissances actuelles concernant la physiopathologie de l'évolution du DT2, nécessaire à la compréhension de la maladie et de l'évolution du prédiabète et DT2. La partie suivante rassemblera les connaissances actuelles sur les traitements

pharmacologiques existants. Nous passerons ensuite en revue deux stratégies thérapeutiques qui font l'objet de ce travail : l'impact positif de l'activité physique et ceux des compléments nutritionnels, dans ce contexte pathologique. A la suite de ce plan, nous développerons la méthodologie générale mise en œuvre durant ce travail au sein de deux études précliniques, sur des modèles animaux du prédiabète :

- L'effet de deux modes d'entraînement sur le métabolisme énergétique de jeunes souris diabétiques
- L'effet d'un complément nutritionnel à base de plantes sur le métabolisme énergétique de jeunes souris diabétiques, et de souris nourries avec un régime riche en graisse.

Une discussion générale sur l'intérêt de ces deux approches dans un contexte de DT2 et les perspectives envisagées concluront ce document.

4. REVUE DE LITTÉRATURE

4.1. PHYSIOPATHOLOGIE DU DIABETE DE TYPE 2

4.1.1. Introduction

Le DT2 correspond à l'incapacité des cellules bêta du pancréas à produire une quantité suffisante d'insuline, son action étant rendue moins efficace par l'installation d'une résistance des tissus à ce peptide (51 acides aminés) (Shoback, D. et Gardner, D. 2011). Au moins 8 tissus sont ainsi impliqués dans le développement de la pathologie, à des degrés différents (DeFronzo, R. A. 2009). Le chapitre suivant propose donc de présenter l'état des connaissances concernant chacun d'entre eux, en mettant l'accent sur quatre organes principaux : la cellule bêta du pancréas, responsable de la production de l'insuline et trois tissus directement impliqués dans la régulation de la glycémie, le tissu adipeux, le muscle squelettique et le foie.

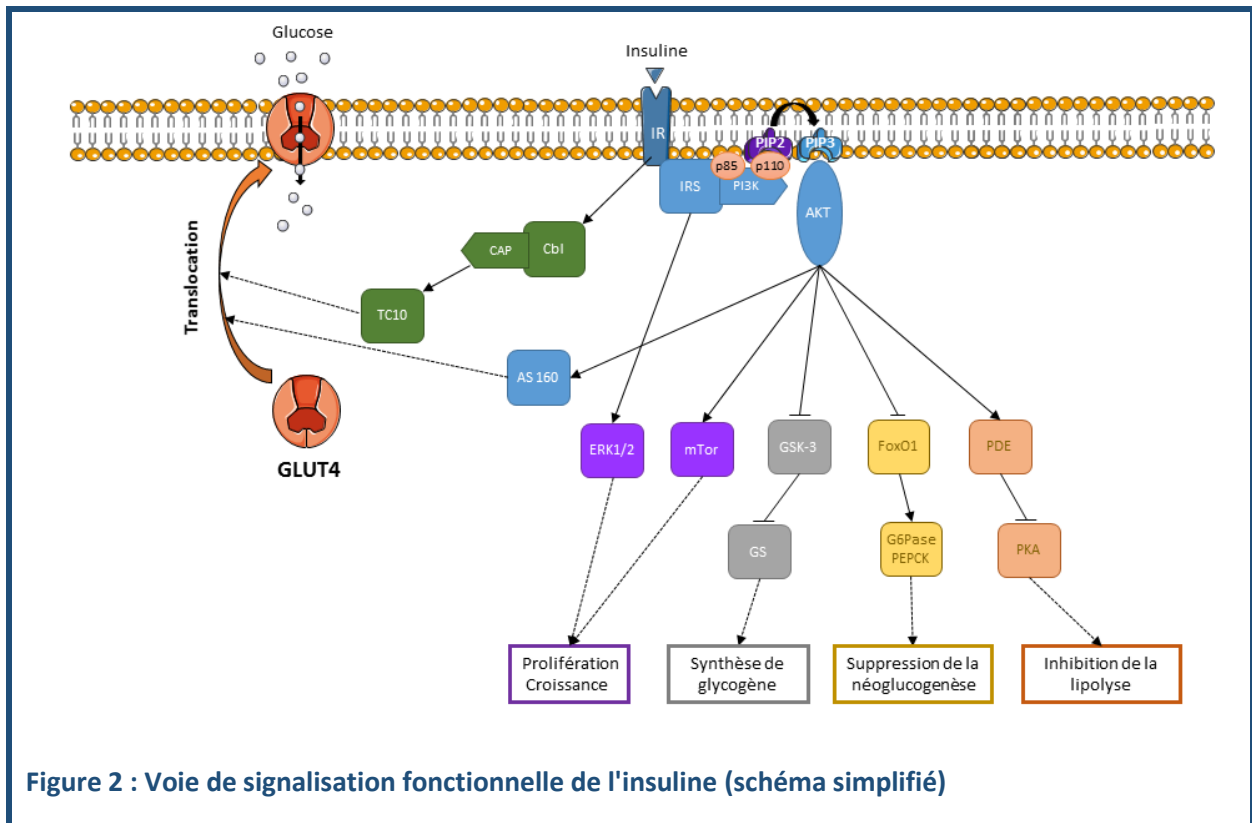
Dans ces derniers, la résistance à l'insuline s'explique par un dysfonctionnement de la voie de signalisation cellulaire de cette hormone. Ainsi, nous nous attacherons dans une première partie à rappeler le fonctionnement de la voie de l'insuline, qui présente des mécanismes communs dans ces organes, avant de développer le rôle de chacun des tissus impliqués dans la physiopathologie du DT2.

4.1.2. Signalisation insulinique

En condition non pathologique, de l'insuline est produite par les îlots de Langerhans des cellules bêta du pancréas, en réponse à une élévation systémique de la glycémie. Le rôle principal de cette hormone est de se fixer sur son récepteur, présent à la surface de nombreux organes, afin de provoquer la captation du glucose sanguin (principalement dans le muscle squelettique et le tissu adipeux) ou l'arrêt de la production de glucose destiné à la circulation sanguine (principalement dans le foie).

En l'absence d'insuline, le récepteur est maintenu en configuration inactive via une contrainte inhibitrice de ses sous-unités α . La liaison de l'insuline à son récepteur permet l'autophosphorylation des résidus tyrosine présents dans les sous-unités β (Van Obberghen, E. *et al.* 2001), et déclenche une cascade de phosphorylation, à la base de laquelle se trouvent les IRS (*Insulin Receptor Substrate*). Ceux-ci se phosphorylent sur leurs résidus tyrosines, lesquels sont reconnus par la sous-unité p85 d'une enzyme, la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), dont la sous-unité catalytique p110 phosphoryle à son tour un phosphoinositide membranaire appelé phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP2) pour former du phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3). Sont ainsi générés des sites de reconnaissance pour d'autres kinases cellulaires, telles que la protéine kinase B également connue sous le nom d'Akt (Capeau, J. 2003). Celle-ci, activée par phosphorylation, va à son tour phosphoryler

et activer d'autres relais intracellulaires impliqués dans les effets métaboliques de l'insuline, en particulier AS160 (*Akt substrate of 160 kDa*), qui provoque la translocation des transporteurs du glucose (Glut4) et l'entrée du glucose sanguin dans la cellule. D'autres voies importantes sont également activées par cette cascade de phosphorylation, notamment des voies associées à la prolifération cellulaire et à la croissance (via ERK1/2 et mTor), à la synthèse de glycogène (via GSK-3), à la suppression de la néoglucogenèse (FoxO1) ou à l'inhibition de la lipolyse (via l'enzyme Phosphodiesterase (PDE)) (King, M. W. 2017) (cf. Figure 2).



Plus récemment, une nouvelle voie de signalisation en aval du récepteur à l'insuline et participant également à la fonction de captation de glucose a été mise en évidence dans les cellules musculaires et graisseuses (Bryant, N. J. *et al.* 2002). La fixation de l'insuline à son récepteur tyrosine kinase phosphoryle également un substrat appelé Cbl (Ribon, V. et Saltiel, A. R. 1997), lequel, par interaction avec la protéine CAP, se dissocie du récepteur et se transloque sur un radeau lipidique (Baumann, C. A. *et al.* 2000). Il active alors l'enzyme TC10 (Chiang, S. H. *et al.* 2006), laquelle active la translocation des Glut4 et donc la captation du glucose, de manière complémentaire à la voie PI3K-Akt décrite plus haut, pour obtenir une réponse complète de la stimulation par l'insuline (Chiang, S. H. *et al.* 2001). Cette voie est présentée de manière synthétique en vert sur la Figure 2.

Dans les principaux organes insulino-sensibles, l'insuline active l'ensemble de ces voies à des degrés différents en fonction de l'abondance des protéines clefs impliquées, ce qui entraîne donc des effets

distincts en fonction des organes. Dans le muscle, c'est principalement la voie de la translocation des Glut4 et la voie de la synthèse du glycogène qui sont activées (Shulman, G. I. *et al.* 1990). Le muscle squelettique apparaît donc comme l'un des organes principaux impliqués dans la captation du glucose sanguin. Le tissu adipeux est lui aussi responsable d'une partie de la captation du glucose mais l'effet principal de l'insuline est d'inhiber la lipolyse et donc de diminuer la libération d'acides gras libres dans la circulation (Gastaldelli, A. *et al.* 2017). Enfin, dans le foie, l'effet dominant de l'insuline est l'inhibition de la production hépatique de glucose, ce qui contribue à l'effet hypoglycémiant de l'hormone.

4.1.3. Tissu adipeux blanc

4.1.3.1. Rôle dans la pathogénèse

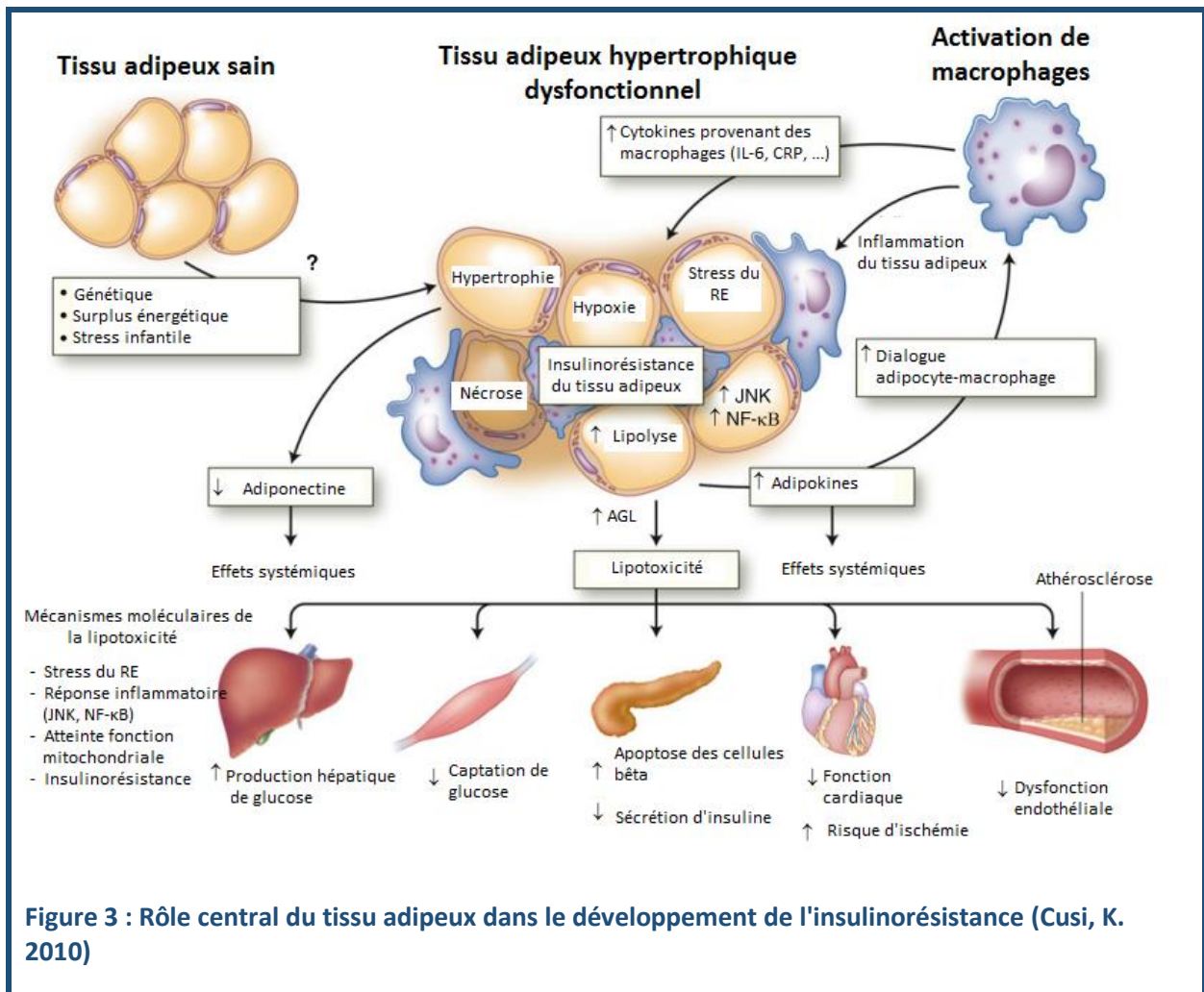
Le tissu adipeux est le réservoir d'énergie de l'organisme. Il est constitué de tissu conjonctif qui contient les cellules graisseuses, appelées adipocytes. Chaque individu possède une capacité limitée de stockage sain du surplus énergétique, sous forme de tissu adipeux sous-cutané, que l'on retrouve principalement sur le tronc chez le sujet masculin, et au niveau des hanches, cuisses et fesses chez la femme (pré-ménopausée). Le tissu adipeux sous-cutané est considéré comme sain car une augmentation de la quantité de ce tissu ne provoque pas d'altérations de la sensibilité à l'insuline ou plus généralement du profil métabolique des sujets (Despres, J. P. *et al.* 1989). Des études montrent que les individus capables de stocker l'énergie sous forme de tissu adipeux sous-cutané sont protégés contre les différents dysfonctionnements liés au syndrome métabolique (Tanko, L. B. *et al.* 2003; Snijder, M. B. *et al.* 2005).

Lors d'un déséquilibre de la balance énergétique en faveur des apports, le surplus d'énergie est donc stocké sous forme de graisse, d'abord préférentiellement dans le tissu adipeux sous-cutané, puis, après saturation des capacités de stockage de celui-ci, dans le tissu adipeux viscéral et de manière ectopique (Bays, H. E. *et al.* 2008). On retrouve par conséquent des stocks de triglycérides à l'intérieur et autour des viscères (tissu adipeux intrapéritonéal) mais aussi à l'intérieur et autour des muscles, du foie, du cœur, du pancréas *etc.*, ce qui constitue une situation anormale pour ces organes qui sont originellement dépourvus de graisse ectopique.

Le tissu adipeux viscéral et les stocks de graisses ectopiques sont de forts prédictors de l'insulinorésistance, via des mécanismes distincts dépendant de la localisation du dépôt. Ainsi, les dépôts graisseux viscéraux pourraient être à l'origine d'une production continue de cytokines pro-inflammatoires (Wisse, B. E. 2004), telles que la résistine, TNF- α , certaines interleukines ou encore de facteurs qui stimulent la réponse inflammatoire d'autres tissus (Bays, H. E. *et al.* 2008). On parle alors d'un état d'inflammation chronique dit de « bas grade », fortement associé à l'insulinorésistance (de Luca, C. et Olefsky, J. M. 2008). On note également, lors du développement du diabète, une baisse de

la production d'adipokines telles que l'adiponectine, qui a un rôle protecteur contre l'insulinorésistance (Bays, H. *et al.* 2004). Les dépôts de graisse dans les autres organes (muscles, foie, rein, pancréas) sont probablement à l'origine du développement de la résistance à l'insuline de ces tissus, on parle ainsi de lipotoxicité. Les mécanismes impliqués dans chacun d'entre eux seront donc discutés ci-après, dans les parties du manuscrit correspondantes.

Ainsi, par son activité endocrine et la localisation de ses dépôts, le tissu adipeux apparait comme un acteur central dans la physiopathologie du diabète. Ce postulat est illustré par la Figure 3 ci-dessous.



4.1.3.2. Insulinorésistance du tissu adipeux

Le tissu adipeux est également un organe sensible à l'insuline à part entière, cette hormone induisant, comme on l'a vu plus haut, la captation et le stockage du glucose sanguin et l'inhibition de la lipolyse (Gastaldelli, A. *et al.* 2017). La résistance à l'insuline du tissu adipeux correspond donc à l'incapacité de ce tissu à capter du glucose et supprimer la lipolyse en présence d'insuline, participant de fait à l'hyperglycémie systémique et provoquant une élévation des acides gras libres (AGL) dans la

circulation. Les AGL jouent un rôle dans l'insulinorésistance d'autres organes tels que le muscle, le foie ou encore le pancréas, Ces mécanismes seront discutés dans les parties respectives ci-après.

La mesure *in vivo* de la résistance à l'insuline du tissu adipeux représente un défi technique. L'une des méthodes actuelles consiste à étudier la relation entre un index de lipolyse (turnover du palmitate (Fabbrini, E. *et al.* 2012) ou vitesse de production de glycérol (Robinson, C. *et al.* 1998)) et insulinémie (Groop, L. C. *et al.* 1989). Ainsi, plusieurs études ont déjà démontré que le tissu adipeux développe une insulinorésistance au cours du processus de mise en place du DT2 (Bell, L. N. *et al.* 2012; Lomonaco, R. *et al.* 2012; Armstrong, M. J. *et al.* 2014).

Les mécanismes qui sous-tendent l'insulinorésistance du tissu adipeux sont méconnus. Ils semblent toutefois liés au développement de l'inflammation des adipocytes hypertrophiés par une surexposition prolongée à un surplus énergétique (Torres-Leal, F. L. *et al.* 2012). Le tissu adipeux devient alors réfractaire à la stimulation par l'insuline de l'inhibition de la lipolyse (comme vu précédemment) mais également à la stimulation de la lipoprotéine lipase, impliquée dans le stockage de triglycérides dans l'adipocyte (Ong, J. M. et Kern, P. A. 1989; Frayn, K. N. 2001), ce qui entraîne une hausse de la présence d'acides gras libres dans le sang.

La translocation des Glut4 stimulée par l'insuline est également altérée dans les adipocytes insulinorésistants (Miura, T. *et al.* 2001), ce qui a pour conséquence une captation et un stockage du glucose sanguin diminués.

4.1.4. Cellules bêta du pancréas

4.1.4.1. Caractérisation de la dysfonction des cellules bêta

Les cellules bêta du pancréas, localisées dans les îlots de Langerhans, sont responsables de la production d'insuline. Leur implication dans la physiopathologie du diabète semble donc directe. Elle reste toutefois complexe et évolutive : durant les premiers temps du développement du diabète, les taux circulants d'insuline des sujets présentant une glycémie basale élevée ou une intolérance aux glucides sont plus élevés, afin de compenser la moindre sensibilité des tissus périphériques à celle-ci. C'est une phase compensatoire qui intervient dans les premiers temps de l'hyperglycémie, celle-ci stimule ainsi la production d'insuline mais également la prolifération des cellules bêta (Donath, M. Y. *et al.* 2005). Par la suite, en fonction de la susceptibilité individuelle de l'organe et du temps d'exposition au stress qu'est l'excès de glucose (et plus généralement, on le verra, de nutriments), la fonction sécrétoire et le volume des cellules peuvent diminuer (Butler, A. E. *et al.* 2003; Abdul-Ghani, M. A. *et al.* 2006). C'est également le cas pour la stimulation de la production d'insuline par des facteurs indépendants de la glycémie, via les incrétines GIP et GLP-1. (Meier, J. J. *et al.* 2001; Kjems, L. L. *et al.*

2003). Ce phénomène peut se poursuivre jusqu'à perte de fonction partielle ou totale de l'organe, rendant le patient insulino-dépendant, c'est-à-dire dépendant d'une injection d'insuline exogène pour réguler sa glycémie.

L'observation faite des taux d'insuline plus élevés chez le sujet insulino-résistant peut être trompeuse si elle est interprétée comme témoin d'une fonction normale des cellules bêta du pancréas. Certains auteurs ont en effet montré que le volume de cellules bêta du pancréas (Butler, A. E. *et al.* 2003) et leur fonction sécrétoire (Ferrannini, E. *et al.* 2005) étaient tous deux diminués chez des sujets pré-diabétiques qui affichaient pourtant des taux d'insuline circulant plus élevés que les sujets sains. Le taux d'insuline basal peut effectivement rester élevé à cause de la non-utilisation de celle-ci par les tissus cibles, rendus insulino-résistants. Ainsi, la capacité d'augmentation de vitesse de production de l'insuline suite à une augmentation de glucose sanguin constituerait un meilleur marqueur de fonction des cellules bêta que la simple mesure d'insulinémie (DeFronzo, R. A. 2009).

4.1.4.2. Mécanismes physiopathologiques

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer l'initiation ou la progression de la dysfonction de la cellule bêta pancréatique, ou de la diminution du volume global de cellules bêta. Ces différents mécanismes mettent en lien les facteurs environnementaux liés à un excès de nutriments, l'obésité et la susceptibilité génétique individuelle.

Dysfonction mitochondriale et production de stress oxydant

L'augmentation du métabolisme énergétique liée à l'afflux de glucose et d'acides gras dans la cellule bêta entraîne une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), responsables du stress oxydant, lui-même pouvant induire la mort cellulaire. La cellule réagit en augmentant la production d'un agent découplant : UCP2 (*UnCoupling Protein 2*), qui favorise la dissipation du surplus d'énergie sous forme de chaleur, au dépend de la production d'ATP (Krauss, S. *et al.* 2003; Prentki, M. et Nolan, C. J. 2006). L'ATP est une molécule essentielle pour la sécrétion d'insuline. La cellule bêta est en effet équipée de canaux potassium ATP dépendants qui se ferment et dépolarisent la membrane lors de l'élévation du rapport ATP/ADP causé par le métabolisme du glucose (Komatsu, M. *et al.* 2013).

Dysfonctionnement de l'anaplérose et de la cataplérose

L'anaplérose et la cataplérose font référence à deux processus biochimiques du cycle de Krebs qui fournissent les substrats nécessaires au bon fonctionnement de la mitochondrie aboutissant à la production d'ATP. L'activité de la voie de signalisation de l'anaplérose et la cataplérose, en situation saine de compensation du pancréas en cas d'hyperglycémie, est donc augmentée pour permettre une plus grande production d'insuline. Le rôle de cette voie est encore inconnu chez l'homme, mais des

données sur l'animal semblent indiquer que son activité pourrait être réduite dans le cadre du DT2, peut-être à cause de la présence d'acides gras saturés, qui inhibent la voie de signalisation anaplérose/cataplérose, tandis que les acides gras mono-insaturés la stimulent (Prentki, M. et Nolan, C. J. 2006). Le bilan de cette étape défailante est, là-aussi, une moindre production d'ATP conduisant à une moindre production d'insuline.

Déséquilibre du cycle triglycérides/AGL et de la lipolyse

Le cycle triglycérides/acides gras et la lipolyse sont responsables de la balance entre production d'AGL et stockage sous forme de triglycérides. La suractivation et l'inhibition de la lipolyse, provoquées respectivement par surexpression d'une lipase et par ajout d'un inhibiteur pharmacologique, provoquent un dérèglement du cycle triglycérides/AGL et réduit la fonction de production d'insuline de la cellule bêta, suggérant un rôle pour ce cycle dans les mécanismes impliqués dans la dysfonction sécrétoire de la cellule bêta (Prentki, M. et Nolan, C. J. 2006).

Dérèglement de la voie de signalisation de l'AMPK et de l'oxydation des acides gras

La voie de l'AMPK joue un rôle important dans l'oxydation des AGL, protégeant ainsi de la stéatose, au même titre que dans d'autres tissus tels que le foie. L'activité de l'AMPK peut être réduite dans la cellule bêta dans une situation d'excès énergétique, provoquant une baisse de l'oxydation des acides gras et exposant la cellule à une lipotoxicité, qui peut conduire à une apoptose (Prentki, M. et Nolan, C. J. 2006). Ce mécanisme est central pour expliquer la glucolipotoxicité.

Glucolipotoxicité

La glucolipotoxicité désigne les effets toxiques des AGL qui apparaissent dans un contexte d'hyperglycémie. Ainsi qu'indiqué précédemment, ceci proviendrait d'une surutilisation du glucose comme substrat énergétique qui provoquerait une baisse de l'oxydation des AGL, via la voie de l'AMPK, entraînant une accumulation de ces derniers dont une partie est partitionnée en complexes lipidiques cytotoxiques pouvant conduire à la mort cellulaire (Prentki, M. et Nolan, C. J. 2006). Cette hypothèse est l'une des principales mises en avant dans le cadre du DT2, supportée par le fait que la dégradation de la réponse insulinaire des sujets intolérants au glucose est accentuée lorsque ces derniers présentent aussi des taux d'acides gras circulants élevés (Stefan, N. *et al.* 2003).

Fatigue des îlots et stress du réticulum endoplasmique

Dans la cellule bêta, le réticulum endoplasmique (RE) est notamment responsable de la synthèse de l'hormone précurseur de l'insuline : la proinsuline. Le stress du RE, qui peut être occasionné par exemple par une exposition à certains AGL (situation plausible dans un cas d'excès énergétique),

occasionne une synthèse défectueuse de protéines. Ces dernières sont collectivement nommées *Unfolded Protein Response* (UPR), et peuvent être directement responsables d'inflammation voire de mort cellulaire par apoptose, provoquant la baisse du volume de cellules bêta (Eizirik, D. L. *et al.* 2008), mais également de perte de fonctionnalité pancréatique, moins de proinsuline fonctionnelle étant produite. Il est possible qu'une sollicitation excessive du RE pour produire de la proinsuline, particulièrement dans le cas d'une masse de cellules bêta trop faible due à une prédisposition génétique, puisse provoquer un stress sur le RE et occasionner une perte de fonction et des dommages cellulaires via les mécanismes décrits plus haut (Prentki, M. et Nolan, C. J. 2006).

4.1.5. Muscle squelettique

En condition non-pathologique, le muscle squelettique est l'organe responsable d'environ 80% de la captation du glucose stimulée par l'insuline (Thiebaud, D. *et al.* 1982), l'installation de la résistance à l'insuline dans ce tissu le place ainsi comme acteur majeur dans la physiopathologie du diabète.

Les mécanismes cellulaires qui, ensemble, conduisent à l'insulinorésistance restent débattus et partiellement mal connus. Toutefois, certaines données semblent concordantes et ont permis d'avancer plusieurs hypothèses explicatives.

4.1.5.1. Implication de la présence de lipides intramusculaires

L'implication de la présence de lipides intramusculaire représente l'une des pistes centrales. Il semble en effet qu'une relation forte existe entre contenu intramusculaire en lipides et insulinorésistance musculaire (Perseghin, G. *et al.* 1999; Kelley, D. E. *et al.* 2002).

L'élévation dans le sang d'acides gras libres, ou même d'une émulsion de triglycérides entraîne une élévation des taux intramusculaires d'acides gras à longue chaîne, qui activent à leur tour une phospholipase qui conduit à une production de diacylglycérol (DAG) à partir de sources lipidiques endogènes (Yu, C. *et al.* 2002). L'augmentation de la concentration intracellulaire de DAG, mais aussi d'autres formes dérivées d'acides gras, telles que les céramides, est associée à une inhibition de l'activité de protéines en aval du récepteur à l'insuline, résultant, lors de la stimulation par l'insuline, en une captation de glucose diminuée. Le message d'inhibition initié par l'augmentation de la concentration d'acides gras intracellulaire semble transmis par la protéine kinase C theta (PKC- θ), qui, une fois activée, phosphoryle la protéine IRS-1 au site serine 307, ce qui, à son tour, inhibe la phosphorylation d'IRS-1 sur ses sites tyrosines (Samuel, V. T. *et al.* 2010). La cascade de phosphorylation en aval du récepteur est donc inhibée (voir Figure 2 : Voie de signalisation fonctionnelle de l'insuline) et l'insuline ne stimule plus (ou moins) la captation du glucose.

Indépendamment de cela, la présence de lipides intramusculaires peut également être à l'origine d'une inflammation du tissu musculaire (Glass, C. K. et Olefsky, J. M. 2012).

4.1.5.2. Inflammation chronique

Un stockage excessif de masse grasse provoque une réaction inflammatoire du tissu adipeux, qui communique avec d'autres tissus via la libération de cytokines pro-inflammatoires dans la circulation sanguine, entraînant une inflammation généralisée de nombreux tissus, dont le muscle, que l'on nomme inflammation chronique de bas-grade. Celle-ci est responsable de nombreux dérèglements qui sont soupçonnés de provoquer une perturbation de la voie de signalisation de l'insuline. Parmi les cytokines pro-inflammatoires les plus étudiées, on peut citer TNF- α et IL-1 β , ou les ligands des récepteurs de type Toll, qui activent les voies de signalisation JNK et IKK β /NF- κ B (Shoelson, S. E. *et al.* 2006).

La voie JNK semble avoir un rôle central dans l'établissement de la résistance à l'insuline, son activité est en effet élevée chez le sujet insulino-résistant (Masharani, U. B. *et al.* 2011) (certainement via les mécanismes proposés plus haut), et son inhibition restaure la sensibilité à l'insuline, chez 2 modèles de souris obèses (Hirosumi, J. *et al.* 2002). L'activation de JNK semble aboutir, cette fois encore, à la phosphorylation d'IRS sur le site serine 307, inhibiteur de la voie de signalisation de l'insuline (Aguirre, V. *et al.* 2000).

La voie IKK β /NF- κ B, quant à elle, est directement responsable de la production par le noyau de la cellule, de nouvelles cytokines inflammatoires. Son activité est inversement corrélée avec la capacité du muscle à capter le glucose, lors d'une stimulation par l'insuline (Sriwijitkamol, A. *et al.* 2006), mais le mécanisme direct d'action de cette protéine sur la voie de l'insuline reste à ce jour à élucider.

4.1.5.3. Fonction mitochondriale

L'altération de la fonction mitochondriale dans le muscle du sujet insulino-résistant a été décrite pour la première fois à la fin du XXe siècle (Simoneau, J.-A. et Kelley, D. E. 1997; Simoneau, J.-A. *et al.* 1999), déclenchant un intérêt croissant de la part d'autres équipes par la suite. Les études sur le sujet sont nombreuses, et les résultats parfois contradictoires. D'un point de vue quantitatif, les données sont plutôt convergentes, les auteurs concluant à une diminution de la densité mitochondriale (Morino, K. *et al.* 2005; Ritov, V. B. *et al.* 2005), l'une des hypothèses explicatives étant la baisse de l'expression génique d'un des régulateurs majeurs de la biogénèse mitochondriale, PGC1- α (Patti, M. E. *et al.* 2003). En revanche, les données qualitatives sont plus contradictoires. Les résultats de certains auteurs basés sur des expériences *ex vivo* de respiration mitochondriale (Mogensen, M. *et al.* 2007; Phielix, E. *et al.* 2008) ont conclu à une forte diminution de la fonction mitochondriale chez des sujets

diabétiques comparés à des sujets sains ou obèses non diabétiques. D'autres auteurs ont abouti à la conclusion inverse en mentionnant, après normalisation du contenu en mitochondries, que la respiration mitochondriale n'est pas différente chez les sujets DT2 (Boushel, R. *et al.* 2007). Également, des études chez le rongeur ont montré une adaptation (peut-être transitoire) de la fonction oxydative consécutive à l'exposition à un régime riche en graisse, caractérisée par une augmentation du contenu mitochondrial et des capacités oxydatives (Garcia-Roves, P. *et al.* 2007; de Wilde, J. *et al.* 2008; Hancock, C. R. *et al.* 2008).

Finalement, on se retrouve ainsi avec trois scénarii possibles : fonction diminuée, inchangée ou compensatoire, qui seraient finalement peut-être dépendants de la population étudiée (espèce, ancienneté de la pathologie), de l'approche méthodologique mais aussi de la définition de l'expression « dysfonction mitochondriale » (Montgomery, M. K. et Turner, N. 2015).

La plupart des revues récentes de littérature semblent converger vers l'existence d'une association forte (directe ou indirecte) entre fonction mitochondriale déficiente et résistance à l'insuline ou diabète (Hoeks, J. et Schrauwen, P. 2012; Hesselink, M. K. *et al.* 2016; Koliaki, C. et Roden, M. 2016). Montgomery et Turner ont décrit une hypothèse mécanistique qui pourrait lier cette dysfonction et le blocage du signal insulinique : la réduction du contenu en mitochondrie ou de sa fonction pourraient ainsi décroître la capacité de celle-ci à oxyder les substrats énergétiques, ce qui aurait pour conséquence :

- Une diminution du flux d'électrons à travers la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie, ce qui induirait une fuite d'électrons et la génération d'ions superoxydes, suivi d'un stress oxydant et les dommages associés. La mitochondrie réagirait en activant les voies de mitophagie voire de l'apoptose, aggravant encore la baisse d'utilisations de substrats énergétiques.
- Une accumulation de lipides intracellulaires à cause de la fonction oxydative défaillante, qui, ainsi que décrit plus haut en paragraphe §4.1.5.1 : *Implication de la présence de lipides intramusculaires*, est une cause directe d'inhibition de la cascade de signalisation insulinique, via l'activation d'intermédiaires lipidiques tels que les DAG et les céramides.

Cette hypothèse est développée dans la Figure 4 : Mitochondrie et résistance à l'insuline

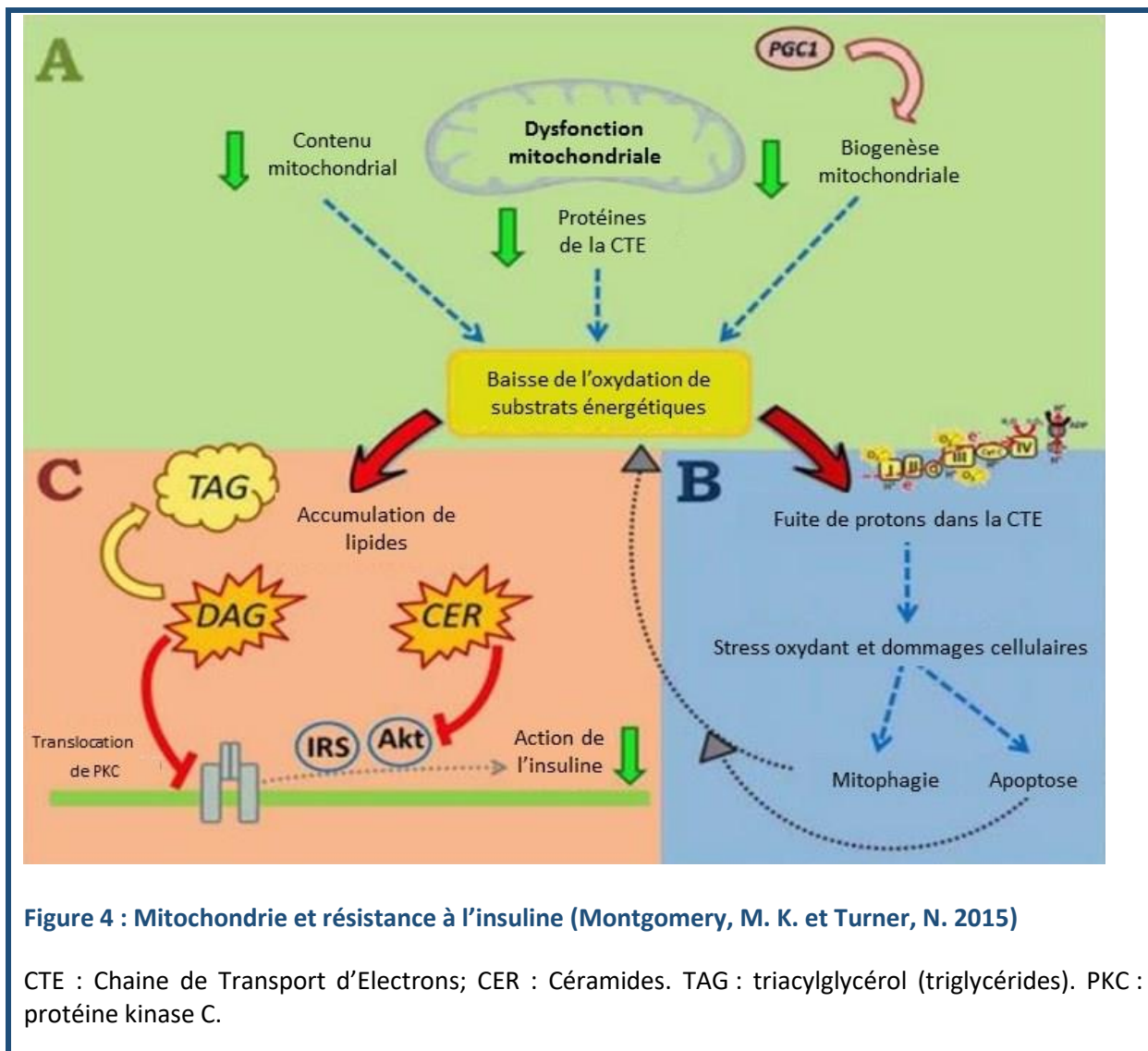


Figure 4 : Mitochondrie et résistance à l'insuline (Montgomery, M. K. et Turner, N. 2015)

CTE : Chaîne de Transport d'Electrons; CER : Céramides. TAG : triacylglycérol (triglycérides). PKC : protéine kinase C.

4.1.5.4. Stress oxydant

Chez le patient DT2, l'abondance de marqueurs de stress oxydant dans le plasma est corrélée à l'apparition des dysfonctionnements métaboliques (Nourooz-Zadeh, J. *et al.* 1997), cette relation étant particulièrement vraie dans le muscle squelettique (Henriksen, E. J. *et al.* 2011). Ces agents oxydants semblent provenir d'une part d'une surproduction d'ions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la mitochondrie en condition de surplus d'énergie et d'autre part via le complexe enzymatique NADPH oxydase. Ce dernier est indirectement suractivé par la fixation de l'hormone angiotensine II aux récepteurs AT1 ce qui entraîne de sa part une production d'ions superoxyde (Henriksen, E. J. *et al.* 2011).

Les mécanismes via lesquels les agents oxydants perturbent la voie de signalisation de l'insuline semblent impliquer certaines des kinases citées précédemment : les PKC, $IKK\beta$, JNK, ainsi que les p38 MAP Kinases, qui, comme expliqué plus haut, catalyseraient la phosphorylation de résidus sérines d'IRS-1, inhibant ainsi l'action de l'insuline en aval de son récepteur (Di Meo, S. *et al.* 2017).

4.1.5.5. Stress du réticulum endoplasmique

Le RE est un organite responsable de la synthèse et du transport de protéines au sein de la cellule. Certaines conditions peuvent déclencher un stress du RE, parmi lesquelles l'accumulation de lipides intracellulaires, corrélée à l'insulinorésistance (cf. paragraphe §4.1.5.1) et associée à l'obésité. Il a été montré sur des modèles cellulaires qu'un stress du RE entraînait une inhibition du signal de la voie de l'insuline par l'hyper-activation des kinases JNK et la phosphorylation sur les résidus sérines d'IRS qui en découlent, suggérant un rôle majeur du RE dans la physiopathologie de l'insulinorésistance (Ozcan, U. *et al.* 2004). En accord avec cela, certains auteurs ont montré qu'une réduction du poids de corps chez le sujet obèse conduisait à une baisse du stress du RE et à une sensibilité à l'insuline améliorée (Gregor, M. F. *et al.* 2009).

Le stress du RE conduit à l'activation de trois voies de signalisation appelées collectivement en anglais *Unfolded Protein Response* (IRE1, PERK et ATF6), promotrices à leur tour de facteurs d'inflammation tels que IL-1 β , via la voie IKK β /NF- κ B, des facteurs directement en lien avec l'altération de la voie de l'insuline (cf. 4.1.5.2 : Inflammation chronique), ce qui constitue donc une hypothèse mécanistique du rôle du RE dans l'insulinorésistance (Ringseis, R. *et al.* 2015).

4.1.6. Foie

Le foie est un organe insulino-sensible responsable de plus de 80% de la production de glucose endogène (Choukem, S. P. et Gautier, J. F. 2008) à partir de composés non glucidiques tels que certains acides aminés, le lactate, le glycérol ou le pyruvate. Ce mécanisme, appelé néoglucogenèse, est stimulé par l'action du glucagon et permet de maintenir une glycémie constante, indispensable pour le fonctionnement normal des cellules glucodépendantes (globules rouges, neurones) qui dépendent uniquement de la fermentation lactique issue du glucose pour synthétiser de l'ATP. En condition non-pathologique, lors d'une situation d'hyperglycémie, le foie répond à l'insuline sécrétée par une suppression de la néoglucogenèse et donc du relargage de glucose dans la circulation sanguine, et à une stimulation de la synthèse de glycogène (Samuel, V. T. *et al.* 2010). Ces mécanismes font toutefois défaut dans un contexte de résistance à l'insuline, participant ainsi à l'hyperglycémie systémique du patient diabétique.

4.1.6.1. Implication des lipides intrahépatiques

A l'instar des autres organes, l'une des hypothèses privilégiées pouvant expliquer la baisse d'effet de l'insuline dans le foie est la présence de lipides intracellulaires, à l'origine, dans cet organe aussi, d'une lipotoxicité (Petersen, M. C. *et al.* 2017). Le stress du tissu adipeux induit un état général de lipolyse (cf. paragraphe §4.1.3 : Tissu adipeux et Figure 3 : Rôle central du tissu adipeux dans le développement

de l'insulinorésistance) qui provoque une accumulation de lipides dans les cellules du foie. Certains d'entre eux sont transformés en DAG qui inhibent le récepteur à l'insuline via une phosphorylation de ses résidus thréonine 1160 par la protéine kinase C_e (Petersen, M. C. *et al.* 2017). Il résulte de cette inhibition du récepteur à l'insuline une moindre inhibition de la néoglucogénèse via FoxO1 et une moindre stimulation de la synthèse de glycogène via la voie GSK-3 (cf. Figure 2).

4.1.6.2. Dysfonction mitochondriale hépatique

Si elle reste moins étudiée que dans le muscle, la dysfonction mitochondriale dans le foie constitue tout de même une hypothèse mécanistique avancée par certains auteurs. La revue de Montgomery et Turner, centrée sur la dysfonction mitochondriale dans le muscle, mentionne d'ailleurs que certaines données issues d'études utilisant des modèles animaux résistants à l'insuline créés par génie génétique suggèrent que cette dysfonction pourrait exister aussi dans le foie et être en lien avec la pathologie (Montgomery, M. K. et Turner, N. 2015). Plus récemment, l'équipe de Crescenzo et collaborateurs a publié une revue centrée sur la fonction mitochondriale hépatique dans un contexte d'insulinorésistance induite par l'obésité ou la surnutrition. Les auteurs ont conclu à un lien clair entre nourriture riche en graisse ou en fructose et déficience mitochondriale dans le foie (Crescenzo, R. *et al.* 2016). Dans cette revue encore, au même titre que celle de Montgomery et Turner, les auteurs mettent en relation la perte de capacité oxydative due au stress oxydant, entraînant l'accumulation de graisse intracellulaire qui vient inhiber la voie de l'insuline (cf. paragraphe §4.1.6.1 : Implication des lipides intrahépatiques) tel qu'illustré dans la Figure 4 : Mitochondrie et résistance à l'insuline.

4.1.6.3. Rôle de l'inflammation chronique

L'état d'inflammation de bas-grade et l'élévation du taux d'acides gras libres circulants, caractéristiques d'un contexte de surpoids, et probablement liés à la saturation des capacités de stockage du tissu adipeux (cf. paragraphe §4.1.3.1), conduisent à une résistance à l'insuline d'organes périphériques dont le foie (Kim, O. K. *et al.* 2015). Le tissu adipeux stressé sécrète ainsi dans la circulation sanguine des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-6, ou IL-1 β (cf. paragraphe §4.1.3.1). Le tissu hépatique possède des récepteurs aux cytokines pro-inflammatoires situés à la surface de la cellule (Kim, O. K. *et al.* 2015). L'activation de ces derniers par les cytokines circulantes active la voie IKK β /NF- κ B, responsable de la régulation de gènes qui activent à leur tour la réponse immunitaire de la cellule via l'augmentation de l'expression de nouvelles cytokines pro-inflammatoires. L'inflammation promeut la phosphorylation de JNK, une protéine présente dans de nombreux tissus et directement responsable de l'inhibition de la voie de signalisation de l'insuline, par phosphorylation d'IRS-1 sur ses résidus sérine (cf. paragraphe §4.1.5.2).

4.1.6.4. Stress du réticulum endoplasmique

De la même manière que dans le tissu musculosquelettique, l'obésité et l'infiltration de lipides intracellulaires qui lui est associée est un facteur de stress du RE dans le tissu hépatique (Cnop, M. *et al.*). Les mécanismes associés semblent aussi similaires à ceux rencontrés dans le muscle squelettique et préalablement décrits en paragraphe §4.1.5.5. Brièvement, le stress du RE entraîne une réponse de 3 voies de signalisation appelées UPR, responsable d'une réponse inflammatoire (associée dans le foie à l'insulinorésistance, ainsi que développé ci-dessus en paragraphe §4.1.6.3), de l'activation des protéines C/EBPs, (qui stimulent l'expression de gènes associés à la néoglucogenèse, tels que PEPCK ou G6Pase (Pedersen, T. A. *et al.* 2007)) et de l'activation de JNK, capable d'inhiber la voie de l'insuline via la phosphorylation d'IRS-1 sur ses résidus sérine (Kim, O. K. *et al.* 2015).

4.1.7. Implications des autres organes

4.1.7.1. Tractus gastro-intestinal

Implication des incrétines

Le tractus gastro-intestinal est responsable, principalement par contact avec les nutriments lors du passage du bol alimentaire, de la production endocrine d'incrétines, dont le peptide insulino-trope dépendant du glucose (GIP), produit par les cellules K du duodénum et le *Glucagon-Like Peptide-1* (GLP-1), produit par les cellules L de l'iléon et du colon distal. Ce sont les deux protéines les plus actives métaboliquement, notamment de par leur rôle dans la stimulation de la production de l'insuline et l'inhibition de la production de glucagon dans les cellules bêta et alpha du pancréas (Drucker, D. J. 2006). Dans un contexte de diabète, on observe d'une part une résistance des cellules bêta aux effets de GIP (Meier, J. J. *et al.* 2001) et GLP-1 (Kjems, L. L. *et al.* 2003), conduisant à une baisse de la stimulation de la production d'insuline. Egalement, une baisse de la production de GLP-1 est observée (Toft-Nielsen, M. B. *et al.* 2001), au contraire de GIP, dont les niveaux circulants sont plus élevés chez le patient insulinorésistant (Jones, I. R. *et al.* 1989).

Dérèglement de la perméabilité intestinale

La perméabilité de l'intestin permet aux nutriments de passer du système digestif vers le sang, toutefois, une exagération de la perméabilité engendre des complications métaboliques, et représente un facteur de risque pour de nombreuses pathologies, parmi lesquelles l'obésité (Teixeira, T. F. *et al.* 2012), la stéatose hépatique non alcoolique (Festi, D. *et al.* 2014) et le diabète de type 2 (Bischoff, S. C. *et al.* 2014). L'un des mécanismes mis en cause dans ce dérèglement serait l'inflammation liée à la production par certaines bactéries de l'intestin d'endotoxines, telles que le lipopolysaccharide (LPS), dont l'augmentation de la perméabilité intestinale constitue un facteur aggravant. Ce dernier est un

ligand des récepteurs de type Toll, (Erridge, C. 2011) et provoque la production de cytokines pro-inflammatoires, directement liée au développement de l'obésité et du DT2.

Les causes de l'augmentation de la perméabilité intestinale restent mal connues, mais un régime riche en graisse semble en tout cas favoriser son apparition (Pendyala, S. *et al.* 2012).

4.1.7.2. Cellules alpha du pancréas

De nombreuses études ont montré très tôt que les taux de glucagon étaient anormalement élevés chez les patients atteints de DT2 (Unger, R. H. *et al.* 1970; Baron, A. D. *et al.* 1987), suggérant une dysfonction des cellules responsables de sa production : les cellules alpha, situées dans les îlots de Langerhans du pancréas. Cette hormone étant directement responsable de la stimulation de la néoglucogénèse dans le foie, on comprend aisément pourquoi une hausse de ses taux circulants favorisent l'hyperglycémie chronique, d'autant plus que certaines données semblent indiquer que les sujets diabétiques pourraient être hypersensibles à l'action du glucagon (production hépatique de glucose plus élevée pour un même niveau de glucagon) (Matsuda, M. *et al.* 2002).

L'hyperglucagonémie observée semble être le résultat d'une résistance des cellules alpha aux effets inhibiteurs de l'insuline et de l'incrétine GLP-1 (Godoy-Matos, A. F. 2014).

4.1.7.3. Rein

Le rein est responsable de la filtration du sang. Le glucose sanguin est ainsi filtré par cet organe, avant d'être réabsorbé pour être remis dans la circulation via deux transporteurs actifs : les cotransporteurs glucose sodium dépendant 1 et 2 (SGLT1 et SGLT2). En cas de glycémie normale, 100% du glucose est filtré puis réabsorbé pour éviter l'hypoglycémie (Abdul-Ghani, M. A. et DeFronzo, R. A. 2008). En revanche, en cas d'hyperglycémie (en moyenne, chez le sujet sain, à partir d'1,7 à 1,8 g.l⁻¹), ce transport actif est partiellement inhibé afin de permettre l'évacuation d'une partie du glucose dans les urines. Ce mécanisme, appelé glycosurie, est défaillant chez les sujets DT2, qui affichent un seuil rénal de glucose (seuil d'hyperglycémie à partir duquel la réabsorption de glucose est inhibée) plus élevé que la moyenne (Lawrence, R. D. 1940) à cause peut-être d'un dysfonctionnement de l'inhibition de SGLT1 et SGLT2, d'une augmentation de leur activité ou de leur abondance (Rahmoune, H. *et al.* 2005).

4.1.7.4. Cerveau

L'insuline est un puissant suppresseur d'appétit (Plum, L. *et al.* 2006). Pourtant, dans les premières phases du DT2 caractérisées par une hyperinsulinémie compensatoire, la prise énergétique des sujets reste élevée, suggérant que l'insulinorésistance des tissus périphériques s'étend peut-être aussi au cerveau, en lien avec la régulation de l'appétit (DeFronzo, R. A. 2009). Plus précisément, la réponse inhibitrice de l'hypothalamus (centre de régulation de l'appétit) suite à une ingestion de glucose

semble altérée chez le sujet obèse insulino-résistant (Matsuda, M. *et al.* 1999). Cette insulino-résistance centrale, caractérisée par un défaut d'inhibition de l'appétit par l'insuline dans l'hypothalamus, pourrait ainsi contribuer au développement de la pathologie en maintenant une balance énergétique déséquilibrée, du côté des apports.

4.1.8. Conclusion

La saturation de la capacité de stockage du tissu adipeux, due à un surplus d'apports énergétiques, est une hypothèse explicative convaincante qui lie entre eux l'ensemble des dérèglements et les organes impliqués, plaçant ce facteur environnemental en première ligne de préoccupation pour les patients à risque, ou déjà diabétiques. Une susceptibilité génétique a été également mise en évidence, notamment dans le cas d'une prédisposition à l'obésité (Walley, A. J. *et al.* 2006), qui est, rappelons-le, un facteur de risque indépendant du développement du DT2. Egalement, plusieurs gènes associés au défaut de production d'insuline, de sécrétion d'incrétines ou de conversion de la pro-insuline (l'hormone précurseur de l'insuline) en insuline (Schafer, S. A. *et al.* 2011) ont été identifiés et confèrent un risque accru de développer une dysfonction de sécrétion de l'insuline.

Le développement du DT2 est donc caractérisé par une résistance aux effets de l'insuline qui touche de nombreux organes, directement impliqués dans la régulation de la glycémie ou non, avec de fortes interactions entre eux, le dysfonctionnement de l'un affectant souvent l'autre (cf. Figure 5 : *The ominous octet*). L'insulino-résistance aboutit finalement à un épuisement de la fonction sécrétoire des cellules bêta du pancréas, ce qui rend le patient insulino-dépendant. Ces caractéristiques rendent la pathologie très complexe car évolutive, multifactorielle et présentant des mécanismes physiopathologiques distincts touchant plusieurs organes, mais toujours imbriqués et en lien les uns avec les autres. Par conséquent, les cibles métaboliques des traitements sont très variées et les pistes thérapeutiques très nombreuses, ce qui fera l'objet de la partie suivante de ce manuscrit.

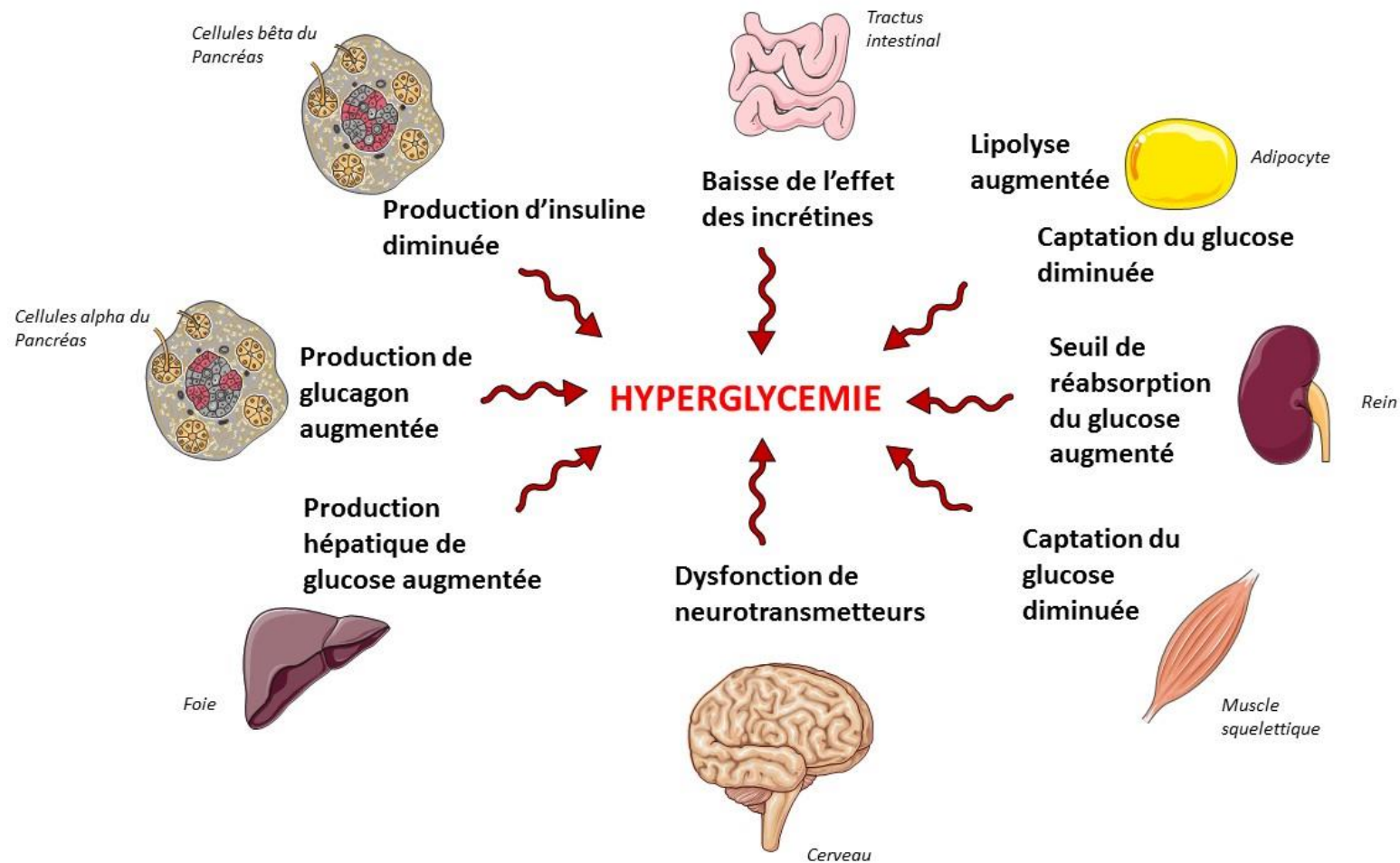


Figure 5 : *The ominous octet* (modifié d'après DeFronzo, R. A. 2009)

4.2. TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES

Alors que le diabète progresse et affecte, de nombreux organes, les recommandations thérapeutiques pharmacologiques se développent dans les mêmes proportions. Cette partie propose une revue des différentes classes de médicaments disponibles à ce jour, de leurs mécanismes d'action, effets secondaires éventuels, ainsi que des recommandations de leur utilisation par les sociétés savantes.

4.2.1. *Classes de médicaments et mécanismes d'action*

4.2.1.1. Insulinothérapie

L'insuline injectable permet de compenser la diminution de production de cette hormone par les cellules bêta du pancréas (cf. 4.1.4 : Cellules bêta du pancréas). Les insulines utilisées de nos jours sont des protéines recombinantes produites par génie génétique. L'insuline est administrée soit en continu par perfusion sous-cutanée par l'intermédiaire d'une pompe à insuline, soit via une ou plusieurs injections sous-cutanées quotidiennes. Elle peut également être dispensée de manière exceptionnelle en intraveineux, dans le cas d'un coma acido-cétosique.

Plusieurs types d'insulines existent et sont classées selon leur délai et durée d'action. On distingue ainsi :

- Les analogues d'insuline ultra-rapides, à la séquence d'acides aminés modifiée pour en accélérer la pharmacocinétique
- L'insuline d'action rapide (la plus proche de l'insuline humaine)
- L'insuline isophane ou NPH, d'action intermédiaire
- Les analogues d'insulines d'action lente
- Les insulines mélangées, analogue d'insuline ultra-rapides + NPH ou insuline rapide + NPH.

Les différences de pharmacocinétique sont obtenues par modification de la séquence d'acides aminés ou adjonction d'additifs, tels que le zinc, qui en retardent l'action. Le mécanisme d'action est le même que celui de l'insuline naturellement produite en condition non-pathologique par le pancréas, et a été décrite en paragraphe §4.1.2 : Signalisation insulinique.

4.2.1.2. Composés insulinosécréteurs

Sulfonylurées et Glinides

Ces deux classes de médicaments regroupent des molécules qui agissent au niveau du pancréas (cf. Figure 6 : Cibles des différentes classes de médicaments) en stimulant la production d'insuline naturelle des cellules bêta (Seino, S. 2012). Ces traitements ne sont donc efficaces que tant que le pancréas est encore capable de produire cette hormone.

Le mécanisme d'action de ces deux types de composés est similaire. En condition physiologique, l'entrée de glucose dans la cellule bêta entraîne une production d'ATP par la mitochondrie, ce qui inhibe les canaux potassium ATP-dépendants. Ces canaux sont spontanément actifs en condition de repos et entretiennent un flux constant de potassium (K^+) hors de la cellule, ce qui maintient un potentiel membranaire de repos négatif (Craig, T. J. *et al.* 2008). L'augmentation du rapport ATP/ADP causée par l'entrée de glucose bloque donc ces canaux, les ions K^+ s'accumulent et provoquent une dépolarisation de la membrane qui ouvre les canaux calcium (Ca^{2+}) voltage-dépendants. L'entrée du calcium dans la cellule active à son tour la production de pro-insuline, hormone précurseur de l'insuline. Les sulfonylurées et les glinides agissent en inhibant les canaux potassium ATP-dépendants (Proks, P. *et al.* 2002), mimant ainsi l'action d'une entrée de glucose dans la cellule.

Les différences entre les molécules disponibles parmi les sulfonylurées et les glinides résident principalement dans leur affinité et leur vitesse de dissociation avec leur récepteur, ce qui entraîne des pics d'insulines plus ou moins élevés et une durée de stimulation variable en fonction du choix du composé (Blickle, J. F. 2006).

Incrétinomimétiques

Les incréto mimétiques sont une classe de molécules réunissant les agonistes au récepteur du GLP-1 (Unger, J. R. et Parkin, C. G. 2011). Elles agissent ainsi en se fixant sur les récepteurs du GLP-1 dans les cellules bêta et alpha du pancréas, stimulant par conséquent la production d'insuline et inhibant la production de glucagon (cf. paragraphe §4.1.7.1 : Tractus gastro-intestinal).

Gliptines

Les gliptines sont des inhibiteurs d'une enzyme appelée dipeptidyl peptidase-4 (DPP-IV), qui est responsable notamment de la dégradation rapide des incréto mimétiques telles que GLP-1. L'inhibition de DPP-IV par ces composés permet ainsi le maintien de la forme active des hormones incréto mimétiques (Barnett, A. 2006), qui stimulent la production d'insuline et inhibent celle du glucagon (cf. paragraphe §4.1.7.1 : Tractus gastro-intestinal) d'où le potentiel thérapeutique de ces médicaments.

4.2.1.3. Composés non-insulinosécréteurs

Biguanides

Les biguanides et son représentant principal, la metformine, constituent l'une des classes de médicaments les plus utilisées, et ce depuis le milieu du XX^e siècle. Contrairement aux composés décrits ci-avant, les biguanides n'affectent pas (que ce soit directement ou indirectement) la sécrétion d'insuline, mais agissent en augmentant la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques. Ainsi la metformine semble inhiber la néoglucogenèse dans le foie et augmenter la captation du glucose dans le muscle et le tissu adipeux. Son effet ne se substitue pas à celui de l'insuline puisqu'elle requiert la présence de celle-ci pour son action (Kirpichnikov, D. *et al.* 2002). Le mécanisme d'action n'est pas encore complètement élucidé, mais il semble que ce composé agisse via une inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Owen, M. R. *et al.* 2000), qui provoque une diminution de la production mitochondriale d'ATP et donc une hausse du rapport AMP/ATP, signal de déplétion énergétique et principal stimulus de l'activation de la protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate (AMPK) (Foretz, M. et Viollet, B. 2010). L'AMPK est un senseur énergétique de la cellule qui pourrait jouer un rôle central dans le diabète, puisqu'elle mobilise les voies qui aboutissent à la synthèse d'ATP et inhibent celles qui en consomment (Foretz, M. et Viollet, B. 2009). L'ensemble des processus cellulaires qui visent à produire de l'ATP sont ainsi activés : stimulation de l'oxydation lipidique, de l'entrée de glucose dans la cellule via la translocation des Glut4, inhibition des voies anaboliques (synthèse lipidique et protéique) et inhibition de la néoglucogenèse (Winder, W. W. et Hardie, D. G. 1999), ce qui pourrait expliquer son effet sensibilisant à l'action de l'insuline. A long terme, les effets observés sur la diminution de la stéatose hépatique non alcoolique (excès de stockage de triglycérides dans le foie), pourraient également contribuer à l'action bénéfique de la metformine sur la sensibilité à l'insuline hépatique (Foretz, M. et Viollet, B. 2009; Foretz, M. et Viollet, B. 2010), la présence excessive de lipides intracellulaires dans le foie constituant l'une des hypothèses mécanistiques privilégiée par la communauté scientifique, dans le cadre du DT2 (cf. paragraphe §4.1.6 : Foie).

Glitazones

Les glitazones, également appelés thiazolidinediones, constituent une classe de médicaments introduits à la fin des années 1990. Ils ont été retirés du marché en 2011 (pour plus d'information, se reporter au paragraphe §4.2.3 : Limites et effets indésirables) mais sont toujours prescrits dans d'autres pays d'Europe et aux Etats-Unis. A l'instar des biguanides, ils agissent en améliorant la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques. Leur mécanisme d'action est en revanche bien distinct, puisqu'ils ciblent et activent les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR)

(Inzucchi, S. E. *et al.* 2015), une famille de facteurs de transcription activés par leur ligand. L'affinité des glitazones est plus élevée pour PPAR- γ et cet isoforme présente la particularité d'être exprimé préférentiellement dans le tissu adipeux, chez l'être humain (Desvergne, B. et Wahli, W. 1999). Son activation a pour effet de stimuler l'adipogenèse, avec une meilleure sensibilité pour le tissu adipeux sous-cutané (Mori, Y. *et al.* 1999), ce qui pourrait normaliser la lipolyse, très augmentée chez les sujets DT2 et potentiellement responsable des dépôts de graisse ectopiques, eux-mêmes soupçonnés d'être corrélés à l'insulinorésistance des tissus périphériques (cf. paragraphe §4.1.3) (Spiegelman, B. M. 1998). Egalement, bien que les niveaux de PPAR- γ soient 20 à 30 fois plus bas dans le muscle squelettique, il pourrait exister un effet direct des agonistes de PPAR- γ dans cet organe (Park, K. S. *et al.* 1998), d'autant que l'expression musculo-squelettique de PPAR- γ est plus élevée chez le sujet insulinorésistance hyperinsulinémique, en raison d'une potentielle régulation positive de son expression via l'insuline (Park, K. S. *et al.* 1997).

Enfin, un rôle bénéfique des glitazones sur l'inflammation a été décrit (Jiang, C. *et al.* 1998) et pourrait donc jouer un rôle dans la restauration de la sensibilité à l'insuline, (cf. paragraphe §4.1.5.2 : Inflammation chronique). Toutefois, il semble que cet effet n'apparaisse qu'à des doses élevées (en opposition aux effets sur l'adipogenèse qui apparaissent à des doses faibles), plaçant cette hypothèse explicative au second plan (Murphy, G. J. et Holder, J. C. 2000).

Inhibiteurs de l'alpha-glucosidase

Les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase sont une catégorie de médicaments qui, comme leur nom le laisse entendre, inhibent de manière réversible une enzyme du tractus digestif responsable de la dégradation des glucides complexes et des dioses en glucose : l'alpha-glucosidase. Les monosaccharides étant les seuls glucides assimilables par l'intestin, une partie des sucres présents dans l'alimentation ne sont donc pas digérés suite à la prise de ce médicament. Le temps d'absorption des glucides est également rallongé. De ce fait, le pic d'insulinémie postprandial est réduit, et l'effet de cette hormone sur le stockage des triglycérides sanguins dans les tissus l'est d'autant. Les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase permettraient donc de diminuer la glycémie postprandiale mais également d'améliorer le statut métabolique du sujet insulinorésistant en général (Bischoff, H. 1995). L'acarbose, principale molécule utilisée parmi cette classe de médicaments, a ainsi montré des effets bénéfiques sur la réduction de HbA_{1c} chez le patient atteint de DT2 (Scheen, A. J. 1998).

Gliflozines

Les gliflozines sont une classe de médicaments qui agissent sur les SGLT2 du rein (cf. paragraphe §4.1.7.3 : Rein) en les inhibant. Elles limitent ainsi la réabsorption rénale du glucose présent dans le filtrat glomérulaire vers le sang, entraînant une baisse de la glycémie, une partie du glucose sanguin

se retrouvant dans les urines (Shubrook, J. H. *et al.* 2015). Cette classe de composés agit ainsi complètement indépendamment de l'insuline.

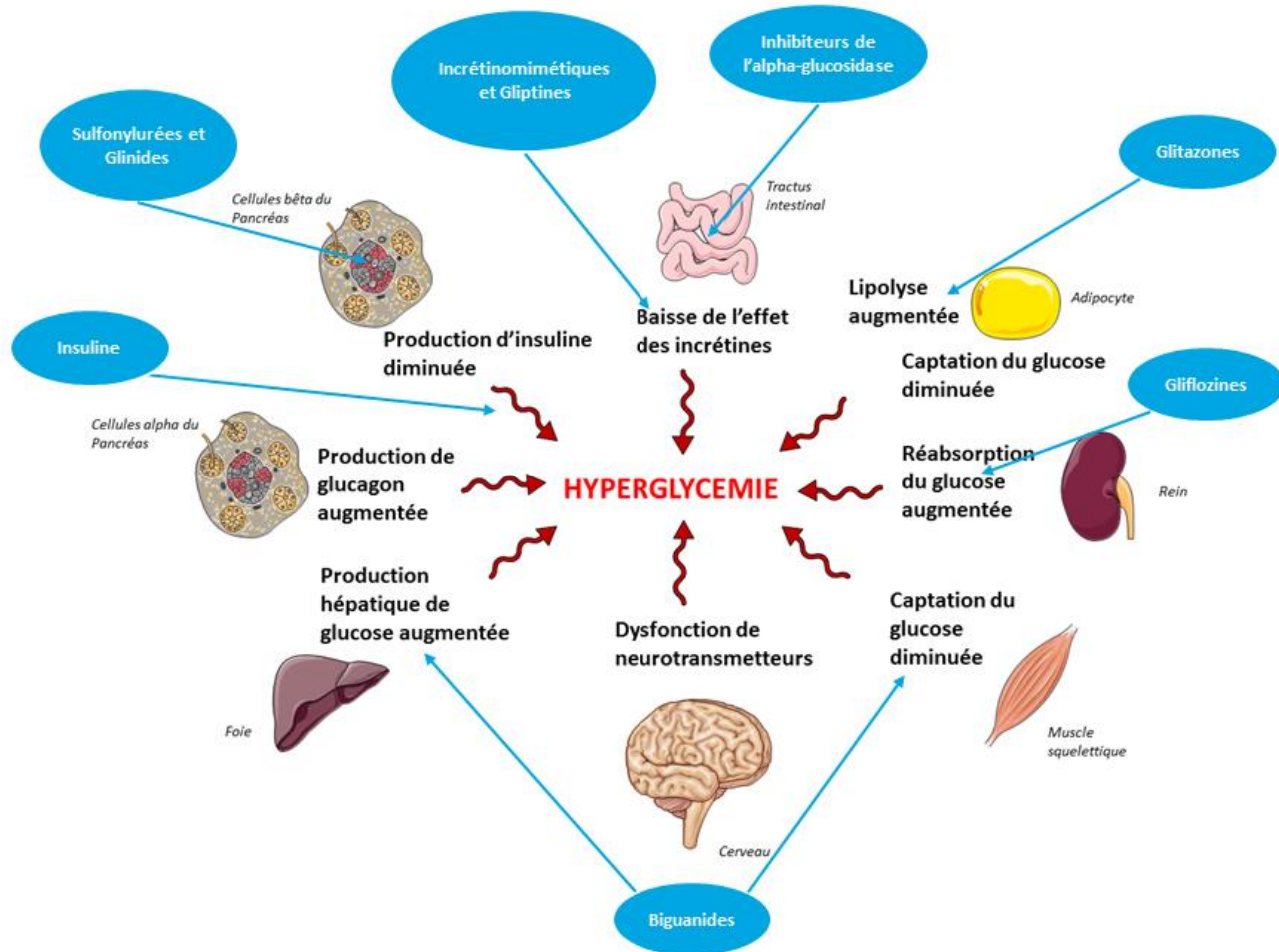
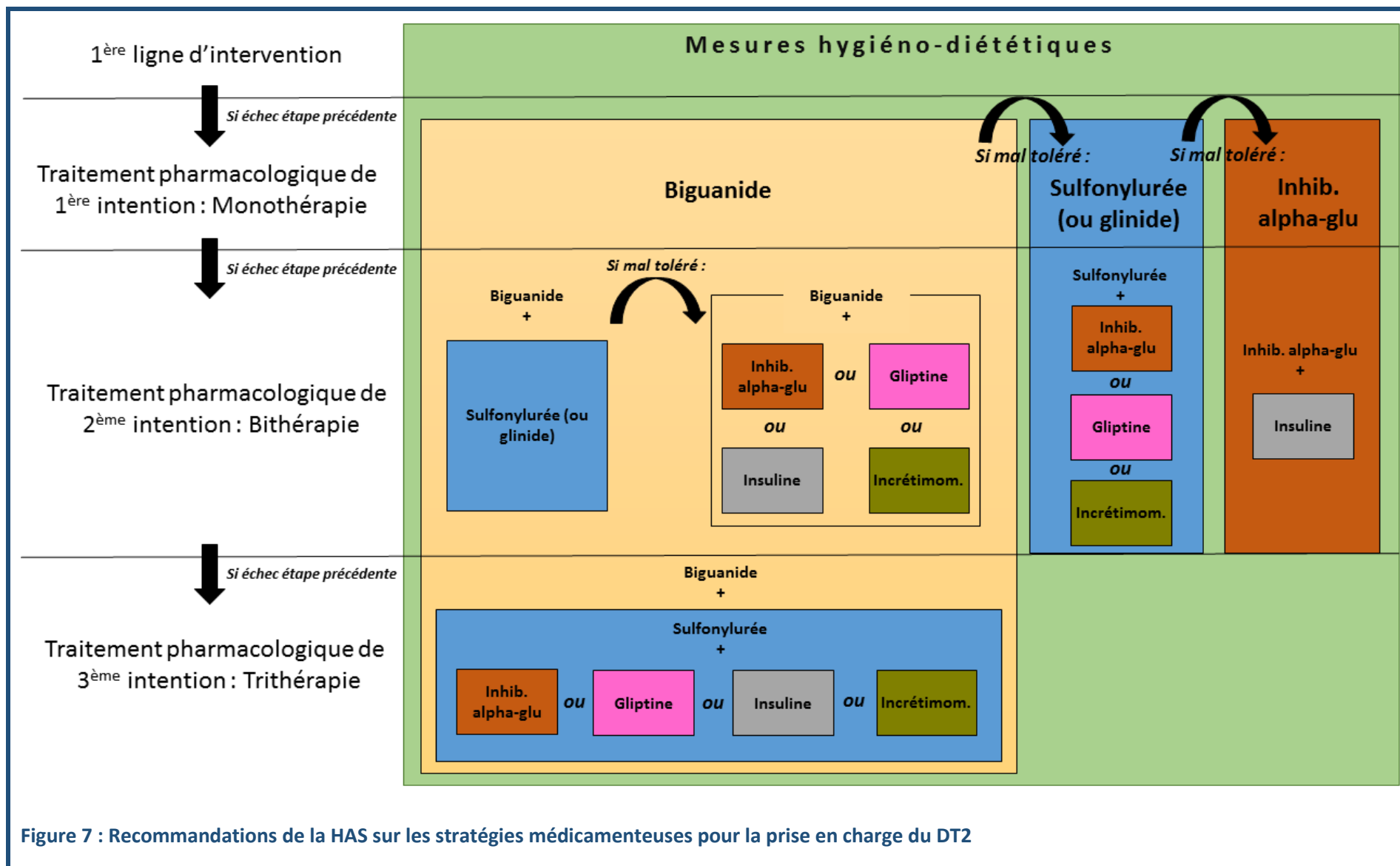


Figure 6 : Cibles des différentes classes de médicaments (modifié d'après Defronzo, R. A. 2009)

4.2.2. Recommandations thérapeutiques

En France comme aux Etats-Unis, en parallèle des recommandations hygiéno-diététiques (activité physique, nutrition) qui représentent une constante dans la prise en charge du DT2, la metformine (médicament de la classe des biguanides) en monothérapie est la solution pharmacologique préférée en première intention, si non contre-indiquée et bien tolérée par le patient (H.A.S. 2014; A.D.A. 2016).

Lorsque les objectifs glycémiques ou concernant HbA_{1c} ne sont pas atteints, les sociétés savantes recommandent une bithérapie, et même une trithérapie en cas de nouvel échec. Des différences peuvent alors apparaître entre les recommandations américaines et Françaises, à cause de l'existence de certains médicaments autorisés d'un côté de l'Atlantique mais pas de l'autre (exemple : les glitazones utilisées aux Etats-Unis mais bannis en France depuis 2012). Les recommandations de la Haute Autorité de Santé (HAS) en France, sont ainsi schématisées en Figure 7 : Recommandations de la HAS sur les stratégies médicamenteuses pour la prise en charge du DT2 (H.A.S. 2014).



Ainsi, en fonction de la gravité du cas du patient et de sa tolérance aux médicaments recommandés, une personne DT2 peut se voir prescrire jusqu'à 3 molécules en même temps. A cela peuvent encore s'ajouter une liste de traitements qui complètent la trithérapie et qui ciblent d'autres symptômes associés au DT2, tels que les médicaments pour le contrôle de la dyslipidémie (statines), de la pression artérielle (antihypertenseurs), du risque thrombotique (aspirine) ou bien des médicaments qui traitent les complications dues au DT2, telles que le soin des lésions du pieds (antifongiques, antiseptiques), les complications oculaires (antiangiogéniques, collyres locaux) ou les complications neurologiques, en cas de neuropathie occasionnant des douleurs (H.A.S. 2014).

Si l'ensemble des médicaments cités ici, et leur combinaison ont prouvé leur efficacité lors d'études cliniques sérieuses (Bennett, W. L. *et al.* 2011), la liste des traitements à administrer pour un patient DT2 peut dans certains cas être très longue. La partie suivante s'attachera à commenter la littérature concernant les limites et effets indésirables de cette approche thérapeutique pharmacologique.

4.2.3. Limites et effets indésirables

Tous les traitements présentés dans la partie précédente ont un coût qui est variable en fonction des composés. L'*American Diabetes Association* propose une classification des classes de médicaments en fonction de leur coût, et l'on peut remarquer que certains parmi les plus utilisés sont classés comme onéreux (gliptines, glifozines, incrétinomimétiques, mais surtout insuline). Naturellement, le coût augmente au fur et à mesure que les traitements se superposent, représentant une charge pour le contribuable.

De plus, chaque classe de médicament peut présenter des effets indésirables, qui s'additionnent évidemment en cas de bi ou trithérapie. Le risque le plus courant est celui de l'hypoglycémie. Commun à tous les composés qui visent à augmenter la quantité d'insuline présente dans le sang, le risque est le plus élevé lors de l'injection directe d'insuline, et diminue à mesure que les traitements ingérés agissent sur la production d'insuline de manière indirecte. Les sulfonylurées et glinides, qui stimulent directement le pancréas, présentent le risque d'hypoglycémie le plus élevé (derrière, rappelons-le, l'insuline injectable), puis viennent les incrétinomimétiques et inhibiteurs de DPP-IV (gliptines), qui présentent un risque plus faible (A.D.A. 2016). On a également rapporté des cas de maux de tête ou de nausées (sulfonylurées, gliptines) et les incrétinomimétiques soulèvent une inquiétude quant à leur effet prolifératif sur les cellules du pancréas qui pourrait augmenter le risque de cancer, mais les études n'ont pas abouti à un lien avéré pour le moment (Forsmark, C. E. 2016). Enfin, les gliptines soulèvent une inquiétude quant à une augmentation faible mais significative du risque de défaillance cardiaque, publiée dans une étude récente (Wu, S. *et al.* 2014).

Le traitement de 1^{ère} intention, la metformine (classe des biguanides), présente des effets indésirables de diarrhée et de dyspepsie, présente chez environ 25% des sujets (Facts_and_Comparisons 2005). De par leur mode d'action, les biguanides sont soupçonnés d'augmenter le risque d'acidose lactique chez les sujets à risque et sont donc contreindiqués en cas d'insuffisance rénale (Salpeter, S. R. *et al.* 2003).

Les glitazones sont probablement la classe de médicaments la plus sujette à inquiétude puisqu'elle a été retirée du marché Français en 2011 suite à un rapport de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) portant sur l'étude de près d'un 1 500 000 patients diabétiques qui avait conclu à un risque plus élevé de cancer de la vessie, chez les sujets traités avec du pioglitazone (molécule de la classe des glitazones) (AFSSAPS 2011). Suite à cela, ces médicaments ont été discontinués dans d'autres pays, comme l'Allemagne, mais sont toujours utilisés aux Etats-Unis, par exemple, où une simple étiquette avertissant du risque a été ajoutée (FDA 2016). Une nouvelle méta-analyse parue en 2013 a confirmé un risque faiblement plus élevé de développer un cancer de la vessie associé au pioglitazone (Ferwana, M. *et al.* 2013).

Pour finir, des effets secondaires liés à des problèmes digestifs ont été rapportés avec l'usage d'inhibiteurs de l'alpha-glucosidase, et un risque d'infections urinaire et de vaginite candidosique a été relevé pour les glifozines (Diabetes.co.uk 2015).

Enfin, étant donné la possible concomitance des traitements, il faut souligner les potentiels effets délétères des interactions entre différentes classes de composés, qui peuvent favoriser le risque d'hypoglycémie par exemple.

4.3. L'ACTIVITE PHYSIQUE

4.3.1. Introduction

L'activité physique constitue une part importante des recommandations prônées par les sociétés savantes (A.D.A. 2004), notamment dans le but d'atteindre l'objectif de perte de poids recommandée de 7%. La thérapie médicamenteuse n'est recommandée qu'en seconde ligne d'intervention (A.D.A. 2016). Une étude récente a également montré que les bénéfices de l'activité physique sur de nombreux paramètres associés au DT2 sont présents indépendamment de la perte de poids (Gaesser, G. A. *et al.* 2011), soulignant encore l'intérêt sa pratique régulière.

En France, les recommandations pour la population générale font l'objet d'un consensus de la part des grandes autorités de santé. L'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) et l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) recommandent 30 minutes par jour d'activité d'intensité modérée à élevée, 5 jours par semaine ou bien 20 minutes d'activité plus élevée, 3 jours par semaine, en complément d'1 à 2 séances de renforcement musculaire par semaine et d'exercices d'assouplissement/mobilité 2 à 3 fois par semaines (INSERM 2008; ANSES 2016). La Haute Autorité de Santé (HAS) reconnaît depuis 2011 le bénéfice de l'activité physique pour les patients atteints de maladies chroniques et a proposé la prescription de l'activité physique en France, comme thérapie non médicamenteuse (HAS 2011). En 2016, l'article 144 de la loi n°2016-41 du 26 janvier 2016 a finalement introduit la possibilité, pour le médecin traitant, de prescrire une activité physique adaptée à la pathologie, aux capacités physiques et au risque médical du patient (dispositif entré en vigueur le 1^{er} mars 2017). L'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) constate que si les recommandations peuvent varier d'un pays à l'autre, toutes tombent d'accord sur la nécessité d'une réduction des apports énergétiques et d'une pratique régulière d'une activité physique composée d'exercices d'endurance et de renforcement musculaire (WHO 2011). Ces recommandations de l'OMS font également consensus avec les recommandations des sociétés savantes françaises citées ci-dessus.

L'OMS reconnaît également les bénéfices d'une activité régulière sur la mortalité toutes causes confondues dans le cadre de la prise en charge des pathologies métaboliques (hypertension, syndrome métabolique, DT2, ...) mais également sur la condition cardiorespiratoire et musculaire et le contrôle du surpoids.

Les bénéfices de l'exercice physique sont aujourd'hui reconnus pour la prise en charge du DT2. Deux méta-analyses récentes prouvent ainsi que l'activité physique, qu'elle se présente sous la forme d'une

promotion d'un style de vie actif (Avery, L. *et al.* 2012) ou d'un engagement des patients dans une activité encadrée (Plotnikoff, R. *et al.* 2013), permet une amélioration du contrôle de la glycémie, définie par une baisse de HbA1c, ce qui représente l'un des objectifs principaux dans le cadre de la prise en charge du DT2.

Plus intéressant encore, l'activité physique utilisée de manière préventive chez le sujet sain pourrait réduire le risque de développer la pathologie d'environ 30%, comme le suggèrent les résultats d'une revue systématique récente, incluant 10 études cliniques et plus de 300000 sujets (Jeon, C. Y. *et al.* 2007). Également, chez le sujet à risque prédiabétique, présentant une intolérance au glucose et une hyperglycémie à jeun modérée (cf. paragraphe §3.2.1 : Evolution du diabète de type 2), mais pas encore de DT2, une intervention sur le mode de vie basée sur les recommandations et objectifs des sociétés savantes (A.D.A. 2016) incluant de l'activité physique apparaît même plus efficace qu'un traitement à la metformine pour diminuer l'incidence du DT2 (4,8 cas pour 100 dans le groupe intervention sur le mode de vie contre 7,8 cas pour 100 dans le groupe metformine), comme le montre une étude sur plus de 3000 sujets prédiabétiques suivis sur près de 3 ans (Knowler, W. C. *et al.* 2002).

L'accumulation de ces preuves d'efficacité, aussi bien en traitement qu'en prévention, pousse ainsi les sociétés savantes à intégrer l'activité physique dans leurs recommandations pour la prise en charge des patients diabétiques ou à risque (prédiabétiques). Là encore, celles-ci font l'objet d'un consensus (Mendes, R. *et al.* 2016) de la part des autorités françaises (Société Francophone du Diabète, SFD (Duclos, M. *et al.* 2013)), européennes (la *European Society of Cardiology*, ESC (Rydén, L. *et al.* 2013) et la *European Association for the Study of Diabetes*, EASD (Inzucchi, S. E. *et al.* 2015)) ou américaines (l'*American Diabetes Association*, ADA, et l'*American College of Sports Medicine*, ACSM (Colberg, S. R. *et al.* 2010)). Ainsi, les derniers guides parus incluent 4 types d'exercices pour la prise en charge des populations diabétiques ou prédiabétiques (Colberg, S. R. *et al.* 2016) :

- *Entraînement aérobie*

Au moins 150 minutes d'activité physique ressentie comme « modérée à vigoureuse » par semaine.

- *Exercices de renforcement musculaire*

Au moins deux sessions d'entraînement en force par semaine, ressenties comme « modérées à vigoureuses ».

- *Exercices de souplesse (à visée d'augmentation de la motricité, sans effet sur la glycémie)*

Au moins 2 à 3 jours par semaine, étirements de 10 à 30 secondes par groupes musculaires.

- *Exercices d'équilibre (prévention des chutes et amélioration de la posture de marche, sans effet sur la glycémie)*

Au moins 2 à 3 jours par semaine, durée laissée libre au patient.

Accessoirement, les auteurs recommandent également d'interrompre toute position assise prolongée par une activité physique légère toutes les 30 minutes, et ne pas laisser passer plus de 2 jours entre chaque session d'exercice.

L'entraînement de type aérobie représente donc une part importante et chronophage des recommandations portant sur l'activité physique. Il vise à développer la fonction cardiovasculaire et le profil métabolique. Pour parvenir à cet objectif, 2 approches sont présentées dans les recommandations, l'entraînement continu à intensité modérée (*Moderate Intensity Continuous Training, MICT*), et l'entraînement intermittent à haute intensité (*High Intensity Interval Training, HIIT*) (Colberg, S. R. *et al.* 2016). Le travail de cette thèse sera donc focalisé sur ces 2 méthodes de développement de l'endurance. Nous ne traiterons pas ici des effets des autres modes d'activités physiques recommandées (renforcement musculaire, souplesse et équilibre). Les parties qui suivent proposent une lecture de la littérature récente afin de faire l'état des connaissances les deux modalités d'entraînement en endurance proposées (MICT et HIIT), afin d'en dégager leurs intérêts et avantages respectifs dans le cadre de la prise en charge du DT2, et de comprendre quels mécanismes sont associés aux effets observés.

4.3.2. Intérêt des modalités de type aérobie dans la prise en charge du DT2 : MICT et HIIT

4.3.2.1. Définitions

Le mode d'entraînement MICT est certainement la méthode d'entraînement utilisée depuis le plus longtemps chez les sujets diabétiques, ou chez le sportif, ce qui pousse certains auteurs à la qualifier de méthode traditionnelle d'entraînement (Gibala, M. J. *et al.* 2006; Colberg, S. R. *et al.* 2010). Il a pour objectif de développer l'endurance et les capacités cardiorespiratoires grâce à des exercices continus à intensité modérée (60 à 75% de la $\dot{V}O_2\text{max}$) de durée longue (30 à 50 minutes) (Ramos, J. S. *et al.* 2015).

On retrouve ainsi la préconisation d'un entraînement continu (30 à 60 minutes) à une intensité correspondant à 50 - 80% de la $\dot{V}O_2\text{max}$ dès la fin des années 90 par les sociétés savantes, suite à l'accumulation des preuves d'efficacité de ce mode d'entraînement sur le métabolisme glucidique et l'insulino-sensibilité (A.D.A/A.C.S.M. 1997).

A l'inverse, le HIIT est défini comme un entraînement comprenant des épisodes courts (inférieurs à 45 secondes) à longs (2 à 4 minutes) d'exercice intense mais non maximal (Buchheit, M. et Laursen, P. B. 2013). Une variante appelée Sprint Interval Training (SIT) correspond à de très courts (inférieurs à 10 secondes) à longs (20 à 30 secondes) sprints « all-out », espacés de périodes de repos. Selon les auteurs, cette variante est intégrée au HIIT ou bien constitue un nouveau mode d'entraînement à part entière. Absent des recommandations de l'*American Diabetes Association* en 2010 (Colberg, S. R. *et al.* 2010), on retrouve pour la première fois mention de ce mode d'entraînement dans les nouvelles recommandations de 2016, où il est présenté comme une alternative efficace à la méthode continue (Colberg, S. R. *et al.* 2016). Les auteurs expriment toutefois quelques réserves quant à la non-dangerosité et/ou l'efficacité de cette méthode pour les sujets diabétiques, faisant écho à un débat existant quant à l'applicabilité sur le long terme de cette méthode d'entraînement à la population générale (Biddle, S. J. et Batterham, A. M. 2015) ou les risques pour les populations fragiles présentant des troubles cardiovasculaires (Levinger, I. *et al.* 2015). De nos jours, la position adoptée est donc de considérer la possibilité d'utiliser le HIIT à la place ou en complément de MICT pour les patients « stables cliniquement, qui ont déjà participé à une activité d'activité modérée auparavant, et sous surveillance » (Colberg, S. R. *et al.* 2016). Plus spécifiquement, s'appliquent les mêmes règles de précaution qu'avant toute implication dans un protocole d'exercice vigoureux, c'est-à-dire l'accord préalable d'un professionnel de santé suite à un diagnostic basé sur l'examen d'un électrocardiogramme pendant une épreuve d'effort (Francois, M. E. et Little, J. P. 2015).

4.3.2.2. Bénéfices sur la santé des patients DT2

Les preuves de l'efficacité des programmes d'exercice continu à intensité modérée sont aujourd'hui appuyées par de nombreuses et grandes études cliniques contrôlées et randomisées. Une méta-analyse réalisée par l'équipe de Boulé en 2001 montre que l'entraînement continu permet d'améliorer le contrôle glycémique (défini ici par une diminution de l'HbA_{1c}) et de développer la $\dot{V}O_2\text{max}$ (consommation maximale d'oxygène mesurée pendant un effort, reflet des capacités d'endurance et associé à une moindre mortalité) de sujets DT2 (Boulé, N. G. *et al.* 2001).

Le mode HIIT, apparu plus récemment, a d'abord suscité un engouement suite à la parution d'études, d'abord sur sujets sains ou même entraînés (Laursen, P. B. *et al.* 2005), montrant des effets bénéfiques sur la fonction musculaire équivalents à ceux de MICT, pour un temps de pratique bien inférieur (Gibala, M. J. *et al.* 2006), plaçant ainsi le HIIT comme une stratégie efficace pour induire des adaptations à l'entraînement dans le muscle squelettique.

Avec le temps, alors que la non-dangerosité de la pratique est de plus en plus admise (Rognmo, O. *et al.* 2012), l'attention des chercheurs et des praticiens s'est déplacée vers la question de l'utilisation de

cette modalité chez les populations pathologiques (Shirayev, T. et Barclay, G. 2012). Ainsi, le HIIT a fait ces dernières années l'objet d'études cliniques qui ont testé son potentiel comme méthode de traitement des symptômes du DT2. Cinq revues de littératures récentes permettent de synthétiser les avis de la communauté scientifique à ce sujet, et de spéculer sur les mécanismes impliqués dans ces adaptations (Gibala, M. J. *et al.* 2012; Little, J. P. et Francois, M. E. 2014; Francois, M. E. et Little, J. P. 2015; Jelleyman, C. *et al.* 2015; Wormgoor, S. G. *et al.* 2017).

Ainsi, l'ensemble de ces revues ou méta-analyses s'accordent pour affirmer que HIIT présente un intérêt dans l'amélioration de paramètres liés au contrôle glycémique et à l'insulino-sensibilité (meilleure glycémie ou insuliniémie à jeun ou score HOMA, HbA_{1c} ou réponse à un test oral de tolérance aux glucides) (Gibala, M. J. *et al.* 2012; Francois, M. E. et Little, J. P. 2015; Jelleyman, C. *et al.* 2015; Cassidy, S. *et al.* 2017), ou encore dans le contrôle de l'hyperglycémie postprandiale (Little, J. P. et Francois, M. E. 2014). Un effet bénéfique est également rapporté sur d'autres paramètres associés au syndrome métabolique, tels que la perte de poids (Wormgoor, S. G. *et al.* 2017) et l'amélioration de la fonction cardiorespiratoire (Francois, M. E. et Little, J. P. 2015; Wormgoor, S. G. *et al.* 2017), la dégradation de cette dernière étant directement prédictive de mortalité chez les patients DT2, elle constitue par ailleurs l'objet principal d'autres revues de littérature (Weston, K. S. *et al.* 2014). Certains auteurs ont discriminé l'effet de cette mode d'entraînement entre populations saines et pathologiques (atteintes d'un syndrome métabolique ou d'un DT2), et concluent que l'effet du HIIT semble plus prononcé chez les populations pathologiques (Jelleyman, C. *et al.* 2015). D'autre part, Little et son équipe remarquent que les adaptations suite à un entraînement de type HIIT pourraient survenir après un temps de pratique nécessaire inférieur et plus rapidement si on le compare aux modalités traditionnelles MICT (Little, J. P. et Francois, M. E. 2014).

Si les conclusions semblent unanimes quant à l'efficacité de la modalité HIIT, les auteurs s'accordent également pour relever de nombreuses limites dans les travaux de recherches déjà publiés, qui rendent les comparaisons avec les autres modalités (telles que le MICT) difficiles et les conclusions définitives délicates, pour une prescription idéale d'activité physique aux populations pathologiques. Ces limites concernent principalement :

- La diversité des protocoles de HIIT utilisés (SIT, protocoles de type windgate « all-out », protocoles d'entraînement intermittents aérobie à intensité plus modérée, ...), qui a fait l'objet de remarques par un groupe d'auteurs, notamment concernant la validité de la terminologie employée qui peut mener à des conclusions erronées, ou à une mauvaise prescription de l'activité (« all-out » répétés un nombre de fois irréalistes, précautions

d'utilisation de protocoles à très haute intensité chez les populations à risques, ...) (Verney, J. *et al.* 2017).

- L'hétérogénéité des volumes d'entraînement, au sein d'une même session, et des durées de protocoles.
- L'hétérogénéité des populations qui ont fait l'objet d'études (sains sédentaires, sportifs, pathologiques).
- Au sein d'une même population (exemple, sujets atteints de syndrome métabolique), l'hétérogénéité des âges et des traitements concomitants.
- Le délai entre les tests portant sur les paramètres mesurés (glycémie à jeun, insulinémie, tolérance aux glucides, ...) et la dernière session d'entraînement.

4.3.2.3. Mécanismes

Pratiquer une activité physique engendre une hausse de la dépense énergétique, en aigu, et incite naturellement les muscles responsables du mouvement à oxyder des substrats afin de resynthétiser l'ATP nécessaire à la production de force. Cependant, les effets du développement des capacités d'endurance, via les méthodes MICT ou HIIT, dépassent la simple augmentation de captation de glucose par le muscle constatée pendant les heures qui suivent un exercice aigu. Il est ainsi décrit un effet persistant de l'entraînement sur la sensibilité à l'insuline (Holloszy, J. O. 2005). Les mécanismes à l'origine de ces adaptations restent encore partiellement incompris, mais sont généralement liés à deux hypothèses (Kirwan, J. P. *et al.* 2017) :

- Un effet métabolique global de l'entraînement en endurance lié à l'éventuelle perte de masse grasse entraînant une baisse de la lipotoxicité systémique et affectant de nombreux organes impliqués dans la physiopathologie du DT2 (cf. paragraphe §4.1 : Physiopathologie du diabète de type 2). Selon certains auteurs, la modalité HIIT pourrait accentuer spécifiquement la perte de masse grasse abdominale et viscérale, ce qui constituerait un bénéfice supplémentaire et pourrait participer à la levée de l'inhibition du signal insulinique dans les tissus périphériques (Francois, M. E. et Little, J. P. 2015; Maillard, F. *et al.* 2017). Cette piste est également évoquée par Jolleyman et son équipe, mais sans constituer l'objet d'une mesure, dans leur méta-analyse (Jolleyman, C. *et al.* 2015). Pour rappel de l'importance du tissu adipeux et de sa localisation dans la pathogenèse du DT2, se rapporter au chapitre *paragraphe §4.1.3.1 : Rôle dans la pathogénèse* de l'introduction de ce manuscrit.
- Un effet musculaire lié à l'activation de l'AMPK consécutive à l'exercice en endurance, qui pourrait être à l'origine de l'activation subséquente de différents gènes en aval impliqués dans la biogénèse mitochondriale, la fonction oxydative et l'oxydation d'acides gras. On rappelle que l'atteinte de la fonction mitochondriale musculosquelettique a été décrite chez les

patients DT2, et constitue une piste mécanistique dans la compréhension de la pathologie (cf. 4.1.5.3 : Fonction mitochondriale). Dans ce cas également, certains auteurs avancent des bénéfices supplémentaires pour la modalité HIIT. Celle-ci permettrait une forte stimulation de la biogénèse mitochondriale qui serait liée aux effets bénéfiques observés sur le contrôle glycémique (Gibala, M. J. *et al.* 2012; Cassidy, S. *et al.* 2017). Les travaux de ces auteurs portaient sur des sujets sains. L'effet de l'entraînement HIIT sur la fonction mitochondriale de patients DT2 a fait l'objet d'une revue de synthèse en 2014, par Larsen et son équipe. Celle-ci n'a pu aboutir, à une conclusion définitive, peut-être à cause de la diversité des protocoles et populations étudiés, et aux éventuelles interactions des traitements (Larsen, S. *et al.* 2014). Les auteurs de la revue en question terminent d'ailleurs par un appel à de nouvelles études sur ce sujet.

Ces deux hypothèses constituent des mécanismes explicatifs potentiels des bénéfices liés à l'amélioration de l'endurance, sans distinction de modalité (MICT ou HIIT). Mais selon certains auteurs, la modalité d'entraînement HIIT pourrait activer des mécanismes différents, bien que ceux-ci soient encore en partie inexplorés, les écueils cités plus haut limitant leur compréhension. Toutefois, il ressort des différentes revues sur le sujet plusieurs pistes mécanistiques privilégiées :

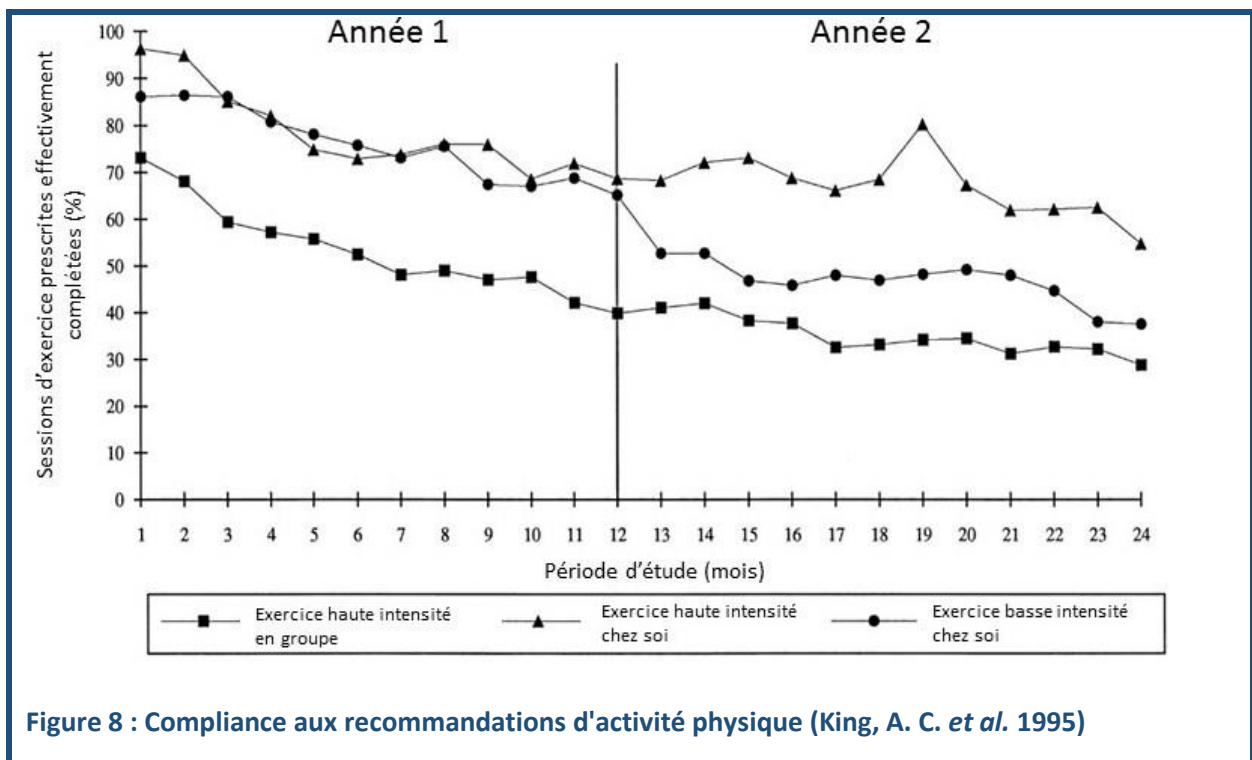
- La déplétion du contenu en glycogène dans le muscle squelettique suite à une session aigue de HIIT constitue une hypothèse avancée par plusieurs auteurs (Little, J. P. et Francois, M. E. 2014; Francois, M. E. et Little, J. P. 2015; Jelleyman, C. *et al.* 2015). Elle pourrait expliquer l'augmentation transitoire de la sensibilité à l'insuline constatée suite à l'exercice aigu en modalité HIIT.
- L'augmentation du contenu en Glut4 musculosquelettique suite à un HIIT chronique constitue également un mécanisme direct, proposé par plusieurs auteurs de ces revues (Gibala, M. J. *et al.* 2012; Little, J. P. et Francois, M. E. 2014; Jelleyman, C. *et al.* 2015; Cassidy, S. *et al.* 2017). Toutefois, les données de la littérature divergent sur ce point. Certains auteurs constatent en effet des niveaux équivalents en protéines et en mRNA de Glut4 chez les sujets diabétiques (Pedersen, O. *et al.* 1990; Eriksson, J. *et al.* 1992), tandis que d'autres rapportent une proportion plus basse de fibres musculaires de type I (lentes, les plus abondantes en Glut4) (Nyholm, B. *et al.* 1997), lesquelles pourraient présenter de surcroît une abondance en Glut4 diminuée (Gaster, M. *et al.* 2001).

Encore une fois, la modalité HIIT semble prometteuse au regard des potentiels mécanismes rapportés par de nombreuses équipes de recherches, mais la comparaison directe avec la modalité MICT est rarement faite, et les investigations ont porté jusqu'ici principalement sur des populations saines, une

interaction avec les pathologies ou les traitements est donc possible et pourrait limiter les adaptations induites via ces mécanismes.

4.3.2.4. Le problème de l'adhésion des sujets aux protocoles d'entraînement

Si les interventions basées sur le mode de vie qui incluent de l'activité physique sont efficaces, elles souffriraient, selon certains auteurs, d'un manque d'adhésion des patients aux recommandations, sur le long terme. Dans une étude transversale récente, Mumu et son équipe ont montré que 25% des sujets diabétiques suivis dans ce travail n'adhéraient pas aux recommandations concernant l'activité physique, ce chiffre étant porté à 89% lorsque l'on prenait en compte l'adhésion aux modifications du régime alimentaire et l'activité physique ensemble (Mumu, S. J. *et al.* 2014). Déjà en 1995, King et son équipe avaient mis en évidence un décrochage progressif de personnes âgées de 50 à 65 ans aux recommandations d'activité physique, majorées lorsque cette activité physique devait s'effectuer en dehors du foyer (cf. Figure 8 : Compliance aux recommandations d'activité physique).



En se basant sur ce constat, il semblait nécessaire pour les équipes de recherche d'orienter leurs travaux vers la découverte de protocoles optimisés qui viseraient à augmenter l'adhésion des sujets aux protocoles d'activité physique. Plusieurs équipes ont déjà tenté d'adresser cette question, en opposant généralement le mode traditionnel d'entraînement MICT aux nouvelles modalités HIIT.

En l'espèce, l'équipe menée par Jonathan Little soutient, à travers ses publications, l'argument de l'obtention d'effets rapides (impliquant un temps de pratique moindre) pour le HIIT, ce qui pourrait

représenter un intérêt certain étant donné que le manque de temps à consacrer à l'activité physique fait partie des freins à la pratique de celle-ci, selon certaines études (Lian, W. *et al.* 1999; Trost, S. *et al.* 2003). Leurs travaux démontrent ainsi des améliorations du contrôle glycémique de patients DT2 ainsi qu'un développement de la fonction mitochondriale musculosquelettique après seulement 6 sessions de HIIT réparties sur 2 semaines (Little, J. P. *et al.* 2011). L'effet sur la fonction mitochondriale avait également été décrit précédemment chez le sujet sain (Little, J. P. *et al.* 2010).

Les résultats obtenus par d'autres équipes suggèrent que le HIIT serait un mode de pratique plus attractif pour le pratiquant, en comparaison à une session intense d'entraînement continu de durée égale (ici, séances de 16 à 20 minutes sur sujets sédentaires sains) (Jung, M. E. *et al.* 2014; Thum, J. S. *et al.* 2017). Des résultats concordants sont par ailleurs obtenus sur des sujets en surpoids peu actifs par une autre équipe (Martinez, N. *et al.* 2015). Toutefois, si le mode HIIT semble présenter plus d'attrait, il est impossible de savoir s'il a entraîné des bénéfices sur le métabolisme ou liés aux adaptations musculaires, car ces paramètres n'ont pas été mesurés dans ces études. Une étude a mesuré les effets de séances de durées égales (30 minutes) de MICT ou HIIT sur l'adhérence et le pic de $\dot{V}O_2$ de sujets en surpoids, et n'a relevé aucune différence sur le plaisir pris pendant la pratique tandis que le pic de $\dot{V}O_2$ augmentait plus dans le groupe HIIT (Vella, C. A. *et al.* 2017).

Difficile donc d'avancer une conclusion définitive, la revue très récente de Wormgoor et collaborateurs révèle d'ailleurs que les bénéfices observés suite à un HIIT apparaissent suite à des protocoles impliquant des sessions de durées supérieures à 40 minutes, soient des durées aussi longues que les séances de MICT à laquelle elles étaient comparées (Wormgoor, S. G. *et al.* 2017).

4.3.3. Interactions avec la metformine

On l'a vu en introduction de ce manuscrit (cf. paragraphe §3.2), les recommandations des sociétés savantes incluent, lorsque les modifications hygiéno-diététiques ne suffisent pas, l'ajout de metformine (A.D.A. 2016). Séparément, les deux thérapies apportent un bénéfice commun, celui d'améliorer le contrôle glycémique des patients. Pourtant, d'une manière qui peut sembler manière surprenante, la somme de ces deux traitements ne mène pas forcément à l'addition de leurs bénéfices pour la santé. Au contraire, les auteurs d'une revue de littérature récente sur le sujet concluent même que l'ajout de metformine peut s'avérer contre-productif pour les adaptations consécutives à l'entraînement sur l'amélioration de la sensibilité à l'insuline, la prévalence du syndrome métabolique et l'inflammation, surtout lorsque des doses élevées du médicament sont utilisés (Malin, S. K. et Braun, B. 2016). D'autres études sont en cours pour essayer de comprendre les relations entre activité physique et cette molécule, notamment en manipulant le timing de la prise du médicament par rapport à la séance l'activité physique, et les raisons des effets délétères sur le contrôle glycémique,

notamment postprandial (Myette-Côté, É. *et al.*). Il est possible également que cet effet apparemment néfaste ne soit que transitoire et finisse par disparaître avec l'entraînement (Boulé, N. G. 2016), au même titre que les effets délétères sur la sensibilité à l'insuline constatés suite à une séance aiguë d'activité excentrique, par exemple (Gonzalez, J. T. *et al.* 2015). Également, d'autres critères, tels que la mortalité, la condition physique ou les facteurs de risques cardiovasculaires devront être pris en compte afin de conclure quant aux effets de l'interaction metformine - activité physique.

4.3.4. Conclusion

Le bénéfice de l'activité physique pour le traitement ou la prévention du DT2 semble avéré, et ce quel que soit le protocole d'entraînement utilisé, cependant l'adhérence à ces protocoles des individus concernés semble problématique. Le mode HIIT présente des atouts indéniables et pourrait constituer une alternative efficace présentant des effets rapides, en comparaison au MICT. Cependant, le manque d'homogénéité des protocoles et des populations a empêché jusqu'à présent les auteurs de revues de synthèse de conclure, quant au vainqueur du match opposant MICT et HIIT pour la prise en charge de patients DT2. De nouveaux travaux comparant les bénéfices de l'une et l'autre des modalités sont souvent encouragés par les auteurs. De plus, de récents travaux ont rapporté un phénomène de résistance aux effets bénéfiques de l'exercice chez certains patients DT2, qui prive certains patients des améliorations attendues par l'activité physique (Stephens, N. A. et Sparks, L. M. 2015).

D'autre part, il a été montré que les mécanismes qui sous-tendent les adaptations bénéfiques observées après l'entraînement étaient encore largement méconnus. Les travaux réalisés jusqu'ici semblent donner l'avantage au mode HIIT, sans certitude définitive, peut-être grâce à une stimulation plus importante du développement de la fonction oxydative, mais ces postulats doivent encore être confirmés. L'identification des mécanismes et leur compréhension doit donc constituer l'objet de la recherche dans ce champ. En effet, mieux connaître les effets de chaque modalité d'entraînement et les mécanismes sous-jacents pourrait permettre une prise en charge thérapeutique optimisée, basée sur la sélection de la modalité agissant sur la cible que l'on privilégie, en fonction de la pathologie et de la population visées.

Ainsi, afin d'optimiser les effets et de les élargir au maximum d'individus, l'identification des modalités d'activité physique les plus adaptées pour la population prédiabétique et DT2 constitue un défi majeur et un moyen pour améliorer les bénéfices sur la santé des patients. La recherche actuelle dans ce champ passe donc par l'inclusion de ces problématiques ainsi que la compréhension des mécanismes afin de proposer une intervention adaptée et optimisée à la population cible.

4.4. COMPLEMENTS NUTRITIONNELS

4.4.1. Introduction

Ainsi qu'il a été énoncé précédemment, les interventions basées sur le mode de vie sont efficaces, et permettent dans certains cas de stopper voire d'inverser la progression du prédiabète et donc de réduire l'incidence du DT2 (Knowler, W. C. *et al.* 2002). Dans ce contexte, les compléments nutritionnels à base d'extraits végétaux se placent comme un outil supplémentaire qui pourrait permettre d'améliorer la prise en charge des personnes prédiabétiques, et plusieurs études sérieuses ainsi que les sociétés savantes ont déjà préconisé leur utilisation dans le cadre de la prévention ou du traitement des symptômes liées aux pathologies métaboliques (Graf, B. L. *et al.* 2010; Reiner, Z. *et al.* 2011). Toutefois, aucun complément nutritionnel n'a pour le moment démontré une tolérance et une efficacité satisfaisantes et, à ce jour, aucun n'a reçu d'opinion favorable de la part de l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (*European Food Safety Authority*, EFSA) pour la délivrance d'une allégation de santé propriétaire, article 14.1a, selon le règlement CE n°1924/2006¹. Plus largement, très peu de produits ont à jour reçu d'opinions favorables de la part de l'EFSA pour l'apposition d'une allégation propriétaire sur leur emballage, et aucun d'entre eux ne concerne un facteur de risque associé au DT2.

L'objectif de la collaboration avec Valbiotis, une société impliquée dans la recherche, le développement et l'innovation scientifique pour la prévention et la lutte des maladies métaboliques, est de développer un complément nutritionnel innovant qui vise à réduire un facteur de risque d'apparition du DT2. Les études cliniques d'efficacité doivent permettre, à terme, l'obtention de l'allégation de santé propriétaire sur la réduction d'un facteur de risque associé à une maladie, tel que défini dans l'article 14.1a.

Dans ce contexte, une revue de littérature suivie d'un screening de plusieurs extraits de plantes seuls ou en combinaison a abouti à la formulation de Totum-63, une composition brevetée copropriété de

¹ En Europe, les allégations présentes sur les emballages sont réglementées depuis la mise en application du règlement CE n°1924/2006, qui différencie les allégations de santé en 2 catégories : allégations génériques (article 13.1, basées sur des preuves générales d'efficacité de composés présents dans un produit donné. Exemple : « Le potassium contribue à une pression artérielle normale ». Tout produit contenant du potassium peut ainsi afficher cette allégation) et allégations propriétaires en relation avec la diminution d'un facteur de risque d'apparition d'une pathologie (Article 14.1a). Pour délivrer non opinion, l'EFSA base son jugement sur la présence de solides preuves scientifiques nouvelles et/ou exclusives au produit, issues d'études cliniques d'efficacité conçues selon les plus hauts standards scientifiques.

la société Valbiotis, de l'Université Clermont-Auvergne, de l'Université de La Rochelle et du CNRS. Cinq extraits composent la technologie :

- Un extrait d'artichaut
- Un extrait de camomille d'or
- Un extrait de myrtille
- Un extrait de feuille d'olivier
- Un extrait de poivre noir

D'un point de vue réglementaire et sécuritaire, les 5 végétaux qui constituent la formulation Totum-63 font partie de la liste de plantes autorisées dans les compléments alimentaires de l'arrêté du 24 juin 2014 (dit arrêté « Plantes »). Cet arrêté établit la liste des plantes, autres que les champignons, autorisées dans les compléments alimentaires et les conditions de leur emploi, garantissant ainsi le bien-fondé et la sécurité de leur utilisation au regard du risque sanitaire.

Les parties qui suivent permettent de faire l'état des connaissances scientifiques sur l'intérêt de chacune de ces plantes, dans le cadre de la lutte contre le DT2.

4.4.2. Artichaut

4.4.2.1. Généralités

L'artichaut (*Cynara scolymus*) est une plante dont on consomme habituellement l'inflorescence en forme de capitule (cf. Figure 9). Très peu énergétique avec moins de 50 kcal aux 100 grammes (ANSES 2016), il est en revanche très riche en polyphénols et en flavonoïdes, ce qui conduit certains auteurs à



Figure 9 : Un champ d'artichauts (*Cynara scolymus*)

le classer comme aliment fonctionnel (Lattanzio, V. *et al.* 2009), c'est-à-dire un aliment apportant un bénéfice supplémentaire en terme de bien-être ou de santé, voire capable de réduire un facteur de risque d'apparition d'une pathologie. Il est utilisé en herboristerie traditionnelle, est a pour réputation de faciliter l'élimination urinaire et digestive et de favoriser la sécrétion de bile (action cholérétique) (Bruneton, J. 2009).

4.4.2.2. Composés présents

Dès le milieu du XX^{ème} siècle, certains composés présents dans l'artichaut ont été isolés et ont

retenu l'attention de certains chercheurs. Une revue de littérature rapporte ainsi que la cynarine (ou acide dicaféylquinique, un polyphénol aux propriétés antioxydantes) a été isolée dès les années 50, afin d'être utilisée pour traiter l'hypercholestérolémie. Toutefois, son effet pour cette application a été remise en cause quelques décennies plus tard (Heckers, H. *et al.* 1977) et un nouveau constituant appelé lutéoline, un flavonoïde, a été mis en évidence et jouerait un rôle crucial dans l'inhibition de la synthèse de cholestérol induite par l'artichaut (Gebhardt, R. 1997; Ben Salem, M. *et al.* 2015).

L'artichaut est aussi l'un des légumes parmi les plus riches en acide chlorogénique, un acide-phénol que l'on retrouve aussi notamment dans les graines de tournesol et le café et qui présente des propriétés antioxydantes (Marinova, E. M. *et al.* 2009), anti-inflammatoires ainsi qu'une action bénéfique sur la régulation du métabolisme glucidique et lipidique (Tajik, N. *et al.* 2017), plaçant ce groupe de molécules comme des candidats de choix dans la lutte et la prévention de nombreuses pathologies, notamment le DT2 (Paynter, N. P. *et al.* 2007). L'abondance naturelle de l'artichaut en composés phénoliques et en flavonoïdes rend probablement difficile la discrimination de l'un ou l'autre d'entre eux pour expliquer les effets bénéfiques observés (détaillés dans la partie suivante), et il est probable que ces derniers soient dus à la synergie de l'ensemble de ces composés.

4.4.2.3. Implications thérapeutiques dans le cadre du DT2

Effet sur la dyslipidémie

La consommation d'artichaut ou d'extraits d'artichaut semble stimuler l'élimination du cholestérol. Une revue récente rapporte que les effets cholérétiques et anti-hypercholestérolémie sont connus depuis le milieu du XX^{ème} siècle (Ben Salem, M. *et al.* 2015), et semble confirmée par certaines données cliniques sur patients DT2, qui ont vu leurs taux de triglycérides, cholestérol total, cholestérol LDL baisser et leur taux de cholestérol HDL augmenter après 90 jours de supplémentation avec un extrait d'artichaut (Nazni, P. *et al.* 2006). L'organisation Cochrane² s'est intéressée dès 2002 aux potentiels effets de l'artichaut sur la dyslipidémie dans une revue systématique (Pittler, M. H. et Ernst, E. 2002) mise à jour en 2009 (Wider, B. *et al.* 2009) et en 2013 qui concluait finalement que les 3 études cliniques qui évaluaient l'effet d'extraits de feuilles d'artichaut pour le traitement de l'hypercholestérolémie laissaient penser qu'un potentiel existait, mais que de nouvelles études seraient nécessaires pour disposer de preuves convaincantes (Wider, B. *et al.* 2013).

Le foie est responsable de la production de bile, qui est stockée dans la vésicule biliaire puis déversée dans le duodénum, où elle exerce une action émulsive sur les lipides notamment, lors du passage du

² Cochrane est une organisation à but non lucratif indépendante qui regroupe plus de 28 000 volontaires dans plus de 100 pays qui a pour but de regrouper des données scientifiquement validées à travers la publication de revues systématiques (et de méta-analyses) d'essais randomisés contrôlés d'interventions en santé.

bol alimentaire. Elle est indispensable aux fonctions digestives. Cette bile contenant naturellement du cholestérol, son excrétion via celle-ci s'est rapidement imposée comme une hypothèse explicative vraisemblable, et a été confirmée sur modèle animal (Saenz Rodriguez, T. *et al.* 2002). Certaines données *in vitro* suggèrent également que d'autres mécanismes pourraient être en jeu, tels que l'inhibition dans le foie de la 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase), une enzyme responsable de la synthèse du cholestérol (Gebhardt, R. 1998).

Effet sur le contrôle glycémique

Plusieurs études sur un modèle animal du diabète de type 1, rendu insulino-dépendant via l'injection d'une drogue qui détruit les cellules bêta du pancréas (streptozotocine ou alloxane), ont montré un effet hypoglycémiant de la complémentation en artichaut (Ahmadi, M. *et al.* 2008; Heidarian, E. et Soofiniya, Y. 2011; Aberomand, M. *et al.* 2013). Une étude clinique a confirmé cet effet sur la glycémie à jeun et la glycémie postprandiale de sujets DT2 non traités avec de l'insuline (Nazni, P. *et al.* 2006). Dans une expérimentation récente sur rats rendus insulino-dépendants via une injection d'alloxane, Ben Salem et son équipe suggèrent que les effets bénéfiques de l'artichaut sur la glycémie pourraient être associés à son activité inhibitrice sur l' α -amylase (une enzyme impliquée dans la digestion des sucres complexes), observée dans ce travail à la fois *in vitro* et *in vivo*, ou bien à un effet sur la sensibilité à l'insuline via l'activité antioxydante de l'artichaut, mesurée également chez ce modèle (Ben Salem, M. *et al.* 2017).

4.4.3. Camomille d'or

4.4.3.1. Généralités

La camomille d'or (*Chrysanthellum indicum* subsp. *afroamericanum* B.L. Turner) fait partie de la famille des Asteraceae, une famille qui regroupe près de 23 000 espèces. Ce sont des arbrisseaux ou des plantes herbacées aux feuilles alternes et aux fleurs de couleur jaune groupées en petits capitules,



Figure 10 : Camomille d'or (*Chrysanthellum indicum*)

pour l'espèce qui nous occupe. Cette plante est originaire du Pérou et de Bolivie mais elle est également commune en Afrique, continent sur lequel elle est principalement cultivée de nos jours (Lièvre, H. et Guillot, B. 1984). On retrouve également une variété proche en Asie, où la plante porte le nom de camomille d'Inde ou camomille de Chine. On lui prête de nombreuses vertus thérapeutiques, généralement attribuées à

sa richesse en flavonoïdes (Jung, S. 2005), le chrysanthellum est d'ailleurs utilisé en médecine traditionnelle chinoise (Zou, P. 2016).

4.4.3.2. Composés présents

Parmi les différents constituants isolés à partir de cette plante, sont considérés actuellement comme constituants actifs : 2 saponosides ou saponines (appelées chrysanthellines A et B), 6 flavonoïdes (dont la lutéoline) et 3 acides phénoliques (acide caféique, acide chlorogénique et acide isochlorogénique) (Gaspar, T. 1994; Jung, S. 2005). Les effets bénéfiques attribués à la consommation de chrysanthellum proviennent probablement de flavonoïdes et des acides phénoliques, donc certains décrits plus hauts sont présents dans d'autres plantes. On retrouve ainsi les acides caféiques et chlorogéniques dans l'artichaut (également présent dans la technologie T-63) mais aussi dans d'autres produits de consommation courante, comme le café, et dont on a déjà documenté les potentiels avantages en termes de santé (cf. paragraphe §4.4.2 : Artichaut). Les saponines (facteurs tensio-actifs), également présents dans la plante, sont des composés d'origine végétale ayant des propriétés moussantes. Ils sont ainsi capables d'agir sur la perméabilité des membranes cellulaires, et pourraient faciliter le passage des flavonoïdes à travers la membrane cellulaire, augmentant ainsi leur biodisponibilité, mais ils pourraient également avoir un rôle spécifique dans les effets bénéfiques observés (Jung, S. 2005).

4.4.3.3. Implications thérapeutiques dans le cadre du DT2

La littérature scientifique est peu fournie en ce qui concerne les effets de la camomille d'or sur la santé, en rapport avec le sujet qui nous occupe. La recherche de revues de synthèse sur le *Chrysanthellum indicum* sur Pubmed ne renvoie par exemple aucun résultat. En élargissant la recherche aux publications expérimentales, on retrouve quelques données récentes issues d'études *in vitro* ou sur modèle animal, centrées principalement sur les actions antioxydantes et anti-inflammatoires de la plante (Yoo, K.-Y. *et al.* 2016; Dong, M. *et al.* 2017; Yang, H.-M. *et al.* 2017), ce qui présente un intérêt dans le cadre de la lutte contre le DT2. Il faut toutefois noter que ces études ont été réalisées sur des modèles pathologiques divers (arthrose, tumeurs, toxicité neuronale, ...) mais aucun de ceux-ci ne sont en rapport avec le diabète, ou même l'obésité. Une autre étude réalisée *in vitro* a montré un effet inhibiteur du *Chrysanthellum indicum* sur certaines enzymes intestinales responsables de la dégradation des glucides (Adisakwattana, S. *et al.* 2012). Comme indiqué précédemment, ces enzymes (telles que l' α -glucosidase) sont la cible de médicaments antidiabétiques oraux (cf. paragraphe §4.2.1.3 : Composés non-insulinosécréteurs), leur inhibition présente donc un intérêt dans le cadre de la lutte contre le développement de la pathologie.

On retrouve également dans la thèse défendue par Séverine Jung en 2005, centrée sur l'intérêt de certaines plantes dans la lutte contre l'hypercholestérolémie (Jung, S. 2005), la trace de travaux

réalisés par une équipe Française dans les années 80, qui ont montré une action hépatoprotectrice et anti-inflammatoire chez le rat (Lièvre, H. et Guillot, B. 1984). La même équipe a également conduit une étude clinique, en complétant des sujets dyslipidémiques avec un extrait concentré de *chrysanthellum indicum*. Les auteurs montrent ainsi une réduction du cholestérol total et des triglycérides circulants (Lièvre, H. *et al.* 1984), ce qui constitue un résultat encourageant, même si l'étude souffre de l'absence de groupe contrôle par placebo.

Enfin, si peu d'études existent à ce jour sur les effets de la camomille d'or dans un contexte de DT2 ou d'insulinorésistance, la plante apparaît dans des articles référençant les plantes efficaces pour le traitement des symptômes du DT2 (Bailey, C. J. *et al.* 1986), et beaucoup d'études se sont attachées à caractériser les effets de flavonoïdes et polyphénols présents en grande quantité dans la plante et communs à d'autres végétaux, l'acide chlorogénique, l'acide caféique et la lutéoline en tête.

4.4.4. Myrtille

4.4.4.1. Généralités

Les myrtilles (*Vaccinium myrtillus*) sont des fruits produits par diverses espèces du genre *Vaccinium*. Ce sont de petites baies comestibles de couleur bleu-violacé. Elles sont très pauvres en énergie, avec moins de 60 kcal pour 100 grammes de baies crues (ANSES 2016), mais sont classées parmi les aliments les plus riches en antioxydants, dont la vitamine C et certains flavonoïdes. On lit souvent qu'elle aurait



Figure 11 : Myrtille (*Vaccinium myrtillus*)

été servie aux pilotes d'avions de l'armée royale britannique, durant la seconde guerre mondiale, afin d'améliorer leur vue la nuit, mais il semble que ces récits soient au mieux invérifiables, au pire infondés, et une revue de littérature récente a finalement conclu que les preuves scientifiques étaient insuffisantes pour avancer qu'un effet de ces baies existe sur la vue (Canter, P. H. et Ernst, E. 2004). La myrtille a été également historiquement utilisée pour traiter le diabète, par consommation de ses fruits ou des feuilles (Cignarella, A. *et al.* 1996). Ainsi, la partie qui suit propose de rassembler les connaissances scientifiques existantes quant aux effets bénéfiques de la myrtille sur cette pathologie.

4.4.4.2. Composés présents

La myrtille contient une variété importante de composés phénoliques, incluant notamment des flavonoïdes divers (quercétine, catéchines), des tannins et des acides phénoliques, mais ce sont les anthocyanes (des pigments appartenant à la famille des flavonoïdes, responsables de la couleur bleue et violette de ces baies) qui constituent la plus grande partie des molécules bioactives présentes dans le fruit (Seeram, N. P. 2008). Les anthocyanes possèdent un potentiel antioxydant important, prouvé *in vitro* (De Rosso, V. V. *et al.* 2008) et sont donc probablement responsables de l'effet antioxydant attribué à la myrtille. Les anthocyanes pourraient également stimuler la sécrétion d'insuline et de GLP-1, d'après les résultats d'une étude *in vitro* (Kato, M. *et al.* 2015), possèderaient un effet anti-inflammatoire via l'inhibition de NF- κ B (Karlsen, A. *et al.* 2007).

4.4.4.3. Implications thérapeutiques dans le cadre du DT2

Une revue de littérature récente a référencé 11 études sur modèle animaux du DT2, induit soit par génie génétique ou un régime riche en graisse. Les mesures incluaient la glycémie à jeun, la sensibilité à l'insuline (évaluée par un test de tolérance à l'insuline ou un score d'insulinorésistance HOMA) ou la tolérance aux glucides (Stull, A. J. 2016). Les auteurs concluent que malgré certains résultats encourageants, les données restent conflictuelles probablement à cause de la diversité des modèles animaux, des mesures et du faible nombre de publications.

Toujours dans cette même étude de synthèse, les auteurs référencent 6 études cliniques sur sujets diabétiques, insulinorésistants ou obèses atteints du syndrome métabolique. Les résultats, ici encore, restent divergents :

- Trois études rapportent un effet bénéfique sur le score d'insulinorésistance HOMA (Li, D. *et al.* 2015), la tolérance aux glucides (Hoggard, N. *et al.* 2013) ou encore la réponse à un clamp hyperinsulinémique euglycémique (Stull, A. J. *et al.* 2010).
- Deux études ne trouvent aucun effet significatif sur le score d'insulinorésistance HOMA (Basu, A. *et al.* 2010) ou sur la réponse à un test de tolérance à l'insuline (Stull, A. J. *et al.* 2015)
- Une étude démontre un effet bénéfique significatif sur la tolérance aux glucides, mais pas sur le score d'insulinorésistance HOMA (Rebello, C. J. *et al.* 2015)

Les effets bénéfiques sont plus souvent observés lorsque les sujets étaient supplémentés en extrait de myrtilles plutôt qu'en myrtilles entières, suggérant que l'irrégularité de la teneur des fruits en composés actifs est une variable fondamentale. La difficulté à reproduire ces résultats chez l'homme *in vivo* provient donc peut-être en partie du fait de la variabilité de l'abondance en anthocyanes des myrtilles utilisées lors des études cliniques (Chu, W. K. *et al.* 2011). Ainsi, un extrait de myrtille

standardisé en anthocyane pourrait permettre une meilleure reproductibilité des résultats. Les auteurs de la revue concluent donc qu'à l'instar des données précliniques disponibles, les résultats sont encourageants, mais que de nouvelles études sont nécessaires pour assoir les preuves (Stull, A. J. 2016).

Plusieurs pistes mécanistiques ont été envisagées pour expliquer les adaptations obtenues, en particulier, un potentiel anti-inflammatoire des myrtilles a été décrit dans plusieurs études sur l'animal (DeFuria, J. *et al.* 2009; Vendrame, S. *et al.* 2013; Mykkänen, O. T. *et al.* 2014), mais aussi chez le patient hypercholestérolémique (Zhu, Y. *et al.* 2013). Plus précisément, les données sur l'animal indiquent une diminution de l'expression de NF- κ B, IL-6 et TNF- α dans le foie et le tissu adipeux, et des concentrations d'IL-6, TNF- α et de protéine réactive C dans le plasma de rats Zucker obèses (Vendrame, S. *et al.* 2013). Ces facteurs sont des marqueurs de l'inflammation grandement impliqués dans l'insulinorésistance systémique (cf. paragraphe §4.1.5.2 et paragraphe §4.1.6.3), l'inhibition de celle-ci pourrait donc permettre une amélioration de la sensibilité à l'insuline. En ce qui concerne l'être humain, les données cliniques existantes restent conflictuelles, avec peut-être en cause, encore une fois, l'hétérogénéité des préparations (myrtilles entières ou extraits standardisés) et des populations étudiées, un niveau d'inflammation élevé à la base étant peut-être requis pour espérer observer des adaptations (Stull, A. J. 2016).

L'effet antioxydant de la myrtille est également suspecté de jouer un rôle important. Tout comme l'inflammation chronique, on retrouve des niveaux de stress oxydant élevés chez les patients insulinorésistants, et ce dérèglement pourrait jouer un rôle important dans le développement de la pathologie (cf. paragraphe §4.1.5.4). Le fruit est naturellement riche en composés phénoliques connus pour leurs bénéfices antioxydants, et cet effet a par ailleurs été démontré sur des modèles *in vitro* et animaux. Chez l'homme, en revanche, il n'a pour le moment pas pu être mis en évidence, chez des sujets sains présentant un risque plus élevé d'accident cardiovasculaire (Karlsen, A. *et al.* 2007). Selon Chu et ses collaborateurs, l'action antioxydante de composés phytochimiques pourrait ne se manifester qu'en présence d'autres molécules bioactives, ou encore seulement sous des conditions redox particulières, ce qui rendrait difficile la confirmation de ces données *in vitro* ou précliniques chez l'être humain (Chu, W. K. *et al.* 2011).

Une autre piste envisagée est l'activation du facteur de transcription PPAR, qui a été observée *in vitro* et sur des modèles animaux (Xia, M. *et al.* 2005; Scazzocchio, B. *et al.* 2011; Vendrame, S. *et al.* 2014), mais également dans le muscle squelettique et le tissu adipeux chez l'être humain (Seymour, E. M. *et al.* 2011). La famille PPAR est impliquée dans la régulation du métabolisme glucidique et lipidique, et

les agonistes de PPAR représentent même une famille de traitements pharmacologiques qui améliorent la sensibilité à l'insuline (cf. paragraphe §4.2.1.3).

Enfin, ont été décrits de manière plus sporadique des effets de la myrtille sur l'inhibition de l' α -glucosidase (McDougall, G. J. *et al.* 2008), et l'activation de l'AMPK (Takikawa, M. *et al.* 2010) ou d'autres voies de signalisation impliquées indirectement dans la captation du glucose sanguin.

4.4.5. Feuilles d'olivier

4.4.5.1. Généralités

Si l'olive (*Olea europaea*) et son huile sont universellement reconnues pour leurs saveurs et leurs bienfaits, l'utilisation de la feuille d'olivier en gastronomie ou dans un objectif de bénéfices pour la santé est plus marginale. Pourtant, certaines études présentent la feuille d'olivier comme une version



concentrée des composés phénoliques présents dans le fruit et l'huile, avec jusqu'à 1450 mg de polyphénols pour 100 grammes de feuilles fraîches contre seulement 110 mg pour 100 grammes de fruits et 23 mg pour 100 ml d'huile d'olive vierge extra (Silva, S. *et al.* 2006; Kountouri, A. M. *et al.* 2007).

Les oliviers ont une longévité exceptionnelle qui dépasse fréquemment le millénaire, certains spécimens du bassin méditerranéen ont

Figure 12 : Feuilles d'olivier (*Olea europaea*)

un âge estimé à plus de 2000 ans (Carabott, S. 2016). De manière remarquable, ces arbres continuent à produire des fruits.

4.4.5.2. Composés présents

Les composés les plus abondants retrouvés dans les feuilles d'olivier sont le verbascoside, l'apigenin-7-glucoside, la lutéoline-7-glucoside, l'hydroxytyrosol, le tyrosol et l'oleuropéine (Petkov, V. et Manolov, P. 1972). L'hydroxytyrosol est en fait un précurseur de l'oleuropéine, et le verbascoside un glucoside conjugué de l'hydroxytyrosol et de l'acide caféique, les classant ainsi comme des molécules apparentées. (El, S. N. et Karakaya, S. 2009). L'oleuropéine est un composé phytochimique responsable notamment de l'amertume caractéristique de l'huile d'olive, et la découverte de ses propriétés antioxydantes l'ont placé au centre de nombreuses études portées sur ses effets pharmacologiques

(Omar, S. H. 2010). L'oleuropéine ou ses molécules apparentées représentant les composés majoritairement présents dans l'olive et les feuilles d'olivier - jusqu'à 73% des composés totaux identifiés (Liakopoulos, G. *et al.* 2006) - la plupart des bienfaits sur la santé observés leur sont attribués.

4.4.5.3. Implications thérapeutiques dans le cadre du DT2

Un effet hypoglycémiant d'une complémentation en oleuropéine ou en extrait de feuille d'olivier a été décrit sur des modèles animaux du diabète insulino-dépendant (Gonzalez, M. *et al.* 1992; Al-Azzawie, H. F. et Alhamdani, M. S. 2006). Chez l'homme, une étude a évalué l'effet d'une supplémentation avec 500 mg d'extraits de feuille d'olive chez le sujet DT2, et a conclu à une baisse de HbA_{1c} et de l'insulinémie à jeun (Wainstein, J. *et al.* 2012). De manière intéressante, une autre étude réalisée chez des sujets présentant un prédiabète caractérisé par une hyperglycémie à jeun (cf. paragraphe §3.2.1 : Evolution du diabète de type 2), rapporte que les feuilles d'olivier ont réduit le pic de glycémie postprandiale consécutif à l'ingestion d'une charge en amidon, suggérant un effet de celles-ci sur l'inhibition de l' α -amylase (Komaki, E. *et al.* 2003). Cette protéine fait partie d'un groupe d'enzymes impliquées dans la digestion des glucides, qui constituent d'ailleurs la cible de l'une des classes de traitements antidiabétiques oraux (cf. paragraphe §4.2.1 : Classes de médicaments et mécanismes d'action).

Outre ce potentiel mécanisme, l'effet antioxydant de l'oleuropéine et des autres composés phénoliques présents dans la feuille d'olivier est souvent mis en avant pour expliquer les améliorations observées sur la glycémie (El, S. N. et Karakaya, S. 2009; Vogel, P. *et al.* 2014), le stress oxydant étant, on le rappelle, un dysfonctionnement courant retrouvé chez le sujet insulino-résistant contribuant potentiellement à la pathogénèse (cf. paragraphe §4.1 : Physiopathologie du diabète de type 2). Dans une étude réalisée chez le lapin diabétique insulino-dépendant, un marqueur de stress oxydant (taux circulants de malondialdéhyde) était diminué et l'activité de plusieurs enzymes anti-inflammatoires plasmatiques était restaurée suite à 16 semaines de traitement à l'oleuropéine (Al-Azzawie, H. F. et Alhamdani, M. S. 2006).

D'autre part, une étude sur des rats rendus obèses par un régime riche en graisse a montré une réduction de la quantité de tissu adipeux chez le groupe traité à l'oleuropéine, grâce à une augmentation de la thermogénine (UCP-1)³ dans le tissu adipeux brun via la sécrétion de catécholamines (Oi-Kano, Y. *et al.* 2008). Il en résultait une dépense énergétique augmentée, ce qui

³ La thermogénine, ou UCP-1, est une protéine stimulant la thermogénèse par découplage mitochondrial, ce qui entraîne une hausse de la dépense énergétique grâce à une hausse de l'énergie consommée pour produire de la chaleur.

peut présenter un intérêt dans le cadre du DT2 dû à un excès d'apports énergétiques (cf. paragraphe §4.1 : Physiopathologie du diabète de type 2).

Enfin, de manière annexe, une action hypocholestérolémiante et hypotensive a été décrite dans les revues de littératures consacrées aux effets de la feuille d'olivier, sur le sujet humain (El, S. N. et Karakaya, S. 2009; Vogel, P. *et al.* 2014), l'hypercholestérolémie et l'hypertension étant des complications métaboliques fréquemment associées au DT2.

4.4.6. Poivre noir

4.4.6.1. Généralités

Le poivre noir (*Piper nigrum*) est le fruit d'une liane de la famille des pipéracées, qui une fois séché,



produit l'une des épices les plus échangées au monde. Le poivrier noir produit une baie verte, noire ou rouge en fonction du degré de maturité de celle-ci. Les poivres que l'on retrouve en cuisine sont en fait tous de la même espèce, seuls le stade de récolte et la préparation diffèrent :

- Le poivre vert est une baie immature conservée dans une saumure
- Le poivre noir est obtenu à partir de baies presque mûres, fermentées puis séchées
- Le poivre rouge est la baie parvenue à maturité
- Le poivre blanc est constitué de baies mûres débarrassées de leur enveloppe, puis séchées.
- Le poivre gris n'existe qu'en poudre, et correspond à du poivre noir séché et broyé avec le péricarpe.

Figure 13 : Liane de poivre noir (*piper nigrum*)

Comme d'autres épices, le poivre a été utilisé aussi bien en cuisine qu'en médecine traditionnelle, avec des effets qui sont documentés dans les parties qui suivent.

4.4.6.2. Composés présents

Le poivre noir contient une quantité variable d'alcaloïdes responsables du goût piquant de la baie ainsi que des effets bénéfiques sur la santé. Au moins 25 ont été identifiés (Dawid, C. *et al.* 2012), dont la pipérine, composé phytochimique le plus représenté avec à 50 à 100 mg par gramme de poivre noir (R. Jansz, E. et V. Packiyasoathy, E. 1983). C'est donc le principe actif le plus étudié, et la littérature révèle aujourd'hui un large spectre de bénéfices potentiels de cette molécule : antioxydant, anti-

inflammatoire, antidépresseur et un effet amplificateur sur la biodisponibilité d'autres molécules (Derosa, G. *et al.* 2016). Cet effet a été très étudié, notamment sur la biodisponibilité de la curcumine (un composé bioactif présent dans le curcuma) qui est multipliée par 20 chez l'homme, en présence de pipérine (Shoba, G. *et al.* 1998), mais d'autres composés bioactifs sont également concernés tels que le sélénium, la vitamine B6, le bêta-carotène, entre autres (Derosa, G. *et al.* 2016). Les mécanismes impliqués incluent la stimulation de transporteurs dans la lumière intestinale, l'inhibition d'enzymes hépatiques telles que les isoformes CYP3A du cytochrome P450 (responsables de la dégradation dans le foie de nombreuses molécules), l'inhibition de la glycoprotéine P (une pompe ATP-dépendante de la membrane cellulaire qui expulse certaines substances exogènes hors des cellules) et l'inhibition de la glucuronidation (réduisant ainsi l'excrétion urinaire)⁴. Ces propriétés renforcent donc l'intérêt de sa présence dans la composition d'un complément nutritionnel, afin de garantir la biodisponibilité des composés présents. De plus, des bénéfices propres du poivre noir sur la santé ont été rapportés et pourraient avoir un intérêt thérapeutique dans le cadre de la prévention et du traitement du DT2.

4.4.6.3. Implications thérapeutiques dans le cadre du DT2

Des données sur modèles animaux suggèrent un effet bénéfique d'une supplémentation à la pipérine sur la tolérance au glucose, évaluée par OGTT chez des rats (Diwan, V. *et al.* 2013) ou de souris (Choi, S. *et al.* 2013), tous nourris avec un régime riche en graisse. De la même manière, une équipe a noté une baisse de la glycémie à jeun chez un modèle de diabète de type 1 murin (Atal, S. *et al.* 2012), tandis que le score HOMA était réduit chez la souris obèse nourrie avec un régime riche en graisse, suite à une complémentation avec de la pipérine (Jwa, H. *et al.* 2012; Choi, S. *et al.* 2013). Ces équipes ont avancé quelques hypothèses mécanistiques qui impliqueraient une production accrue d'adiponectine par le tissu adipeux, entraînant dans le foie une augmentation de la phosphorylation d'Akt dépendante de l'AMPK et de S6K1 ainsi qu'une translocation des transporteurs Glut2 vers la membrane (Choi, S. *et al.* 2013). Une inhibition de la phosphorylation d'IRS-1 sur ses résidus sérine a également été décrite par une autre équipe, avec des conséquences sur Akt et Glut2 similaires (Jwa, H. *et al.* 2012).

En parallèle, d'autres données sur modèle animal suggèrent un effet bénéfique de la pipérine ou d'un extrait de poivre noir sur le stress oxydant et l'inflammation, deux facteurs largement impliqués dans la physiopathologie du DT2 (cf. 4.1 : Physiopathologie du diabète de type 2). L'équipe d'Umar a montré que l'administration de 100 mg/kg de pipérine réduisait les taux circulants de plusieurs cytokines pro-

⁴ La glucuronidation est un processus hépatique qui consiste en l'ajout d'une molécule, la glucuronide, aux composés exogènes. Ce procédé constitue un marquage qui signale les molécules qui seront ensuite excrétées par voie urinaire.

inflammatoires (IL-1 β , TNF- α , PGE2) et améliorerait le statut oxydatif de rats Wistar affectés par l'arthrose (Umar, S. *et al.* 2013). Des données corroborantes sur le stress oxydant ont été rapportées par l'équipe de Diwan, sur un modèle de rat rendu obèse par un régime riche en graisse, avec une diminution de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène et amélioration du statut antioxydant total (Diwan, V. *et al.* 2013). Egalement, la pipérine pourrait augmenter l'activité d'enzymes protectrices contre le stress oxydant telles que SOD, CAT et GPx (Vijayakumar, R. S. et Nalini, N. 2006).

De manière intéressante, les études citées plus tôt rapportent également chez les animaux testés une perte significative de poids corporel, avec ou sans modification de la prise alimentaire (Jwa, H. *et al.* 2012; Choi, S. *et al.* 2013; Diwan, V. *et al.* 2013). Il est difficile de conclure quant à un éventuel effet de la pipérine sur la diminution de la prise alimentaire chez ces animaux, celle-ci a été rapportée de manière irrégulière, indépendamment du mode d'administration (molécule incorporée dans la nourriture des animaux ou par gavage oral) et de la dose. On peut suspecter que le goût piquant de la molécule gêne les animaux et/ou que la pipérine pourrait activer des voies de suppression de l'appétit. Dans ces études, la perte de masse corporelle était concomitante avec une amélioration du profil lipidique évaluée à travers des paramètres sériques tels que la diminution des taux de cholestérol totaux et du LDL cholestérol et la baisse du taux de triglycérides circulants (Jwa, H. *et al.* 2012; Choi, S. *et al.* 2013). Ces données ont été confirmées en utilisant un extrait de poivre noir en comparaison avec la pipérine seule (Vijayakuma, R. *et al.* 2002). D'autres auteurs ont comparé les effets d'une supplémentation en pipérine en comparaison avec des statines⁵ (atorvastatine et simvastatine), et ont conclu que les effets sur le profil lipidiques étaient comparables entre les deux types de molécules (Jin, Z. *et al.* 2009) (Vijayakumar, R. et Nalini, N. 2006).

En conclusion, ces données semblent intéressantes et potentiellement prometteuses mais souffrent de l'absence d'études réalisées sur l'être humain pour confirmer l'éventuel intérêt de l'utilisation de cet ingrédient dans le cadre du DT2. Pourtant le nombre d'études cliniques ayant testé le poivre noir ou la pipérine est important, mais ses propriétés liées à l'augmentation de la biodisponibilité de nombreux phytochimiques font qu'il est à ce jour exclusivement utilisé en combinaison avec d'autres

⁵ Les statines sont une classe de molécules pharmaceutiques hypocholestérolémiantes parmi les plus communément utilisées pour lutter contre des taux de cholestérol élevés. Elles agissent en inhibant la HMG-CoA réductase, une enzyme présente dans le foie et l'intestin, responsable de l'une des étapes de la synthèse du cholestérol.

produits à l'étude, chez l'homme, dans le cadre de problématiques liées au DT2 ou pour d'autres questions.

4.4.7. Actions potentielles de Totum-63

Le schéma suivant (Figure 14 : Principaux composés phytochimiques et effets attendus de Totum-63) propose de récapituler de manière synthétique les principaux composés phytochimiques actifs connus contenus dans les plantes qui composent Totum-63, d'après les références rapportées dans la revue de littérature ci-dessus.

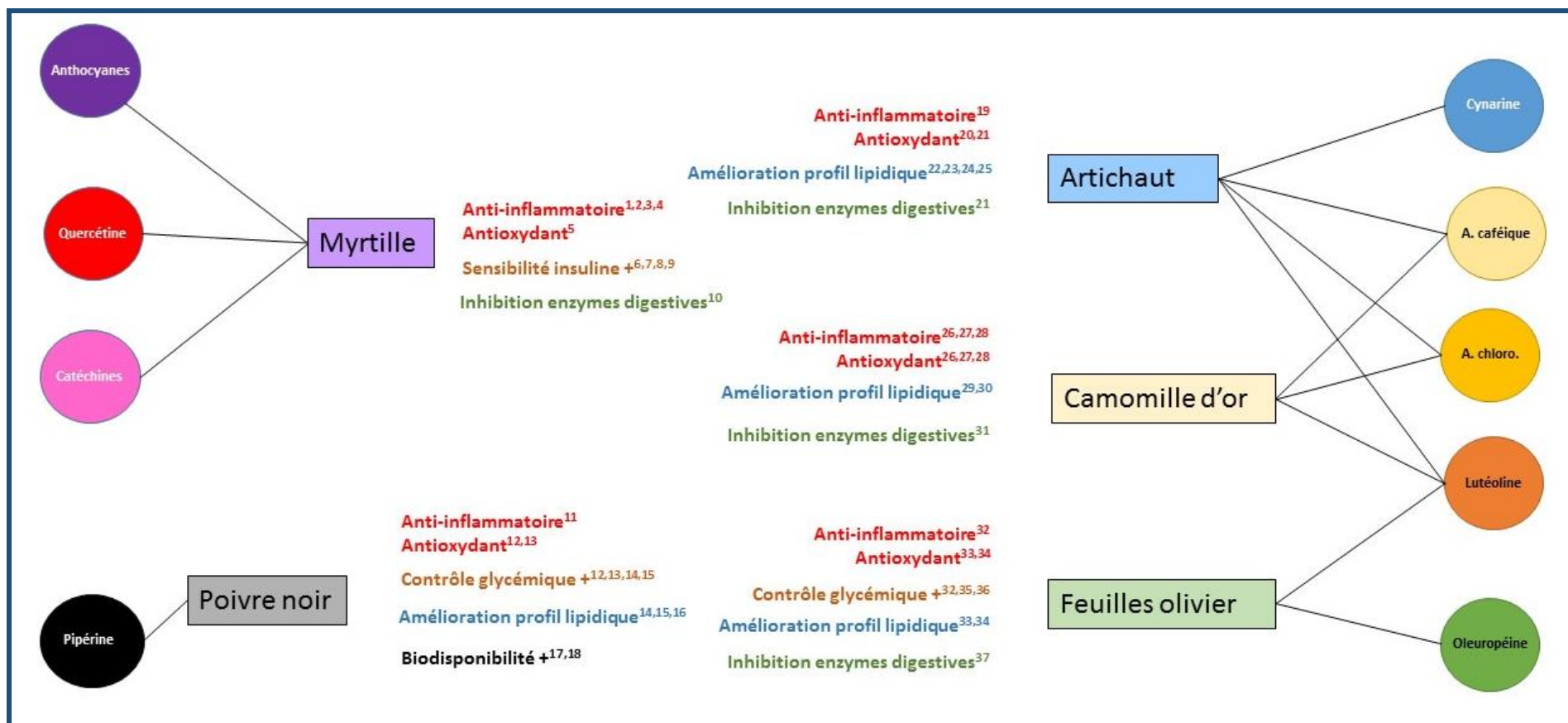


Figure 14 : Principaux composés phytochimiques et effets attendus de Totum-63 dans un contexte de DT2

A. Caféique : acide caféique ; A. chloro : acide chlorogénique. Références :

1. Karlsen, A. *et al.* (2007) ; 2. DeFuria, J. *et al.* (2009) ; 3. Vendrame, S. *et al.* (2013) ; 4. Mykkänen, O. T. *et al.* (2014) ; 5. De Rosso, V. *et al.* (2008) ; 6. Li, D. *et al.* (2015) ; 7. Hoggard, N. *et al.* (2013) ; 8. Stull, A. J. *et al.* (2010) ; 9. Rebello, C. J. *et al.* (2015) ; 10. McDougall, G. J. *et al.* (2008) ; 11. Umar, S. *et al.* (2013) ; 12. Diwan, V. *et al.* (2013) ; 13. Vijayakumar, R. S. *et al.* (2006) ; 14. Choi, S. *et al.* (2013) ; 15. Jwa, H. *et al.* (2012) ; 16. Vijayakuma, R. *et al.* (2002) ; 17. Jin, Z. *et al.* (2009) ; 18. Derosa, G. *et al.* (2016) ; 19. Shoba, G. *et al.* (1998) ; 20. Tajik, N. *et al.* (2017) ; 21. Ben Salem, M. *et al.* (2017) ; 22. Nazni, P. *et al.* (2006) ; 23. Pittler, M. H. *et al.* (2002) ; 24. Wider, B. *et al.* (2009) ; 25. Wider, B. *et al.* (2013) ; 26. Yoo, K.-Y. *et al.* (2016) ; 27. Dong, M. *et al.* (2017) ; 28. Yang, H.-M. *et al.* (2017) ; 29. Jung, S. (2005) ; 30. Lièvre, H. *et al.* (1984) ; 31. Adisakwattana, S. *et al.* (2012) ; 32. Al-Azzawie, H. F. *et al.* (2006) ; 33. El, S. N. *et al.* (2009) ; 34. Vogel, P. *et al.* (2014) ; 35. Gonzalez, M. *et al.* (1992) ; 36. Wainstein, J. *et al.* (2012) ; 37. Komaki, E. *et al.* (2003)

L'ensemble des végétaux sélectionnés présentent ainsi des effets anti-inflammatoires et antioxydants, et une action bénéfique sur le profil lipidique ou le contrôle glycémique (directe ou via une amélioration de la sensibilité à l'insuline). Les mécanismes mis en jeu sont divers, mais certains impliquent peut-être l'inhibition de certaines enzymes digestives. Enfin, en plus de ses bénéfices propres, la pipérine contenue dans le poivre noir présente une qualité unique d'augmentation de la biodisponibilité de nombreux autres composés, renforçant l'intérêt potentiel de sa présence pour assurer l'efficacité des autres ingrédients de la formulation d'un complément nutritionnel tel que Totum-63.

5. OBJECTIFS ET HYPOTHESES DE TRAVAIL

Plusieurs points importants ressortent de cette revue de littérature :

Le DT2 est une pathologie multifactorielle qui touche de nombreux organes (Knowler, W. C. *et al.* 1995), et dont les traitements souvent coûteux peuvent s'accompagner d'effets indésirables pour les patients. La progression du DT2 est préoccupante, et les projections pour les années à venir sont pessimistes (IDF 2015)

Le prédiabète est un stade bien défini (E.C.D.C.D.M. 2003; A.D.A. 2017), il représente une étape clef de l'évolution de la physiopathologie du DT2, pour les acteurs impliqués dans les stratégies de prévention, pour deux raisons importantes :

- Cet état est prédicteur du DT2, dans 70 à 90% des cas, si aucune action n'est réalisée (Tabak, A. G. *et al.* 2012; Tuso, P. 2014)
- Cet état est réversible, notamment grâce à des interventions basées sur le mode de vie, qui présentent une efficacité remarquable (Knowler, W. C. *et al.* 2002).

Dans l'objectif d'empêcher la progression du DT2, cibler le prédiabète apparaît donc comme une stratégie prometteuse et les interventions hygiéno-diététiques (basées sur le mode de vie) se placent comme un outil de choix. L'objectif de cette thèse est d'approfondir les connaissances dans ce champ en étudiant les effets de deux méthodes d'intervention basées sur le mode vie, l'activité physique et l'utilisation d'un complément nutritionnel, Totum-63, développé par la société Valbiotis. Ces deux points constituent les objets respectifs des deux études qui constituent cette thèse, et seront investigués sur des modèles précliniques du prédiabète :

Etude 1 : Effets de deux programmes d'entraînement sur le développement du diabète de type 2 de jeunes souris db/db.

Objectif : Mesurer les effets de deux méthodes d'entraînement en endurance préconisées par les sociétés savantes, MICT et HIIT, sur le contrôle glycémique et la fonction mitochondriale de jeunes souris db/db.

Hypothèse : HIIT améliore le contrôle glycémique de manière plus importante que MICT. Ces adaptations sont expliquées en partie par un développement plus important de la fonction mitochondriale chez HIIT.

Etude 2 : Effet du complément Totum-63 sur le développement du diabète de type 2 de jeunes souris diabétiques db/db et de jeunes souris nourries avec un régime riche en graisse.

Objectif : Mesurer les effets de Totum-63 sur le contrôle glycémique de 2 modèles du prédiabète, la jeune souris diabétique db/db et la souris nourrie avec un régime riche en graisse. Elucider les mécanismes qui sous-tendent ces adaptations.

Hypothèse : Totum-63 retarde l'apparition du DT2 dans ces modèles, via l'amélioration la sensibilité à l'insuline et du contrôle glycémique. Les effets de Totum-63 interviennent de manière pléiotrope dans plusieurs tissus impliqués dans le développement de la pathologie.

6. MATERIEL ET METHODES

6.1. ANIMAUX

Toutes les procédures réalisées sur les animaux ont fait l'objet au préalable d'une approbation par le comité éthique régional (CE2A-02, Auvergne, France). Les souris étaient fournies par JANVIER LABS (France), hébergées (sauf mention contraire) en cages individuelles avec un cycle de jour de 8:00 – 20:00 alterné avec un cycle de nuit.

6.1.1. *Souris BKS(D)-Leprdb/JOrIRj (db/db)*

Les souris mutantes db/db (BKS(D)-Leprdb/JOrIRj) présentent une altération du récepteur à la leptine (OB-R), induisant un dérèglement de la signalisation cellulaire de cette dernière. Les récepteurs à la leptine sont hautement exprimés au niveau de l'hypothalamus, et la fixation de cette hormone sur ses récepteurs provoque une réponse de suppression de l'appétit et de déclenchement de signaux de satiété (Elmqvist, J. K. *et al.* 1999). Ainsi, les souris présentant une mutation de ces récepteurs ne peuvent pas réguler efficacement leurs stocks énergétiques. Il en résulte une prise de masse grasse rapide, entraînant une insulinémie élevée dès les premiers jours de la vie (10 – 14 jours), et une obésité à partir de 3 à 4 semaines avec une augmentation de la glycémie. Ces souris sont insulino-résistantes, hypertriglycéridémiques, et intolérantes au glucose (Coleman, D. L. 1978). Elles présentent ainsi l'avantage d'une évolution rapide des symptômes et sont couramment utilisées pour l'étude de l'insulino-résistance et du diabète car elles présentent une physiopathologie similaire à celle de l'homme (Kennedy, A. J. *et al.* 2010).

Dans les travaux qui seront présentés ci-après, nous avons utilisé des animaux âgés de 6 semaines en début d'expérimentation. Elles présentent à cet âge un surpoids et un début d'hyperglycémie avec hyperinsulinémie compensatoire. Ces animaux sont donc dans une phase de développement de la pathologie, ce qui en fait un modèle intéressant du prédiabète. De plus, ce modèle affiche un développement des symptômes extrêmement rapide, les souris passant d'une glycémie normale à des taux 6 fois supérieurs en 5 à 6 semaines, ce qui renforce son intérêt pour des expériences de screening d'ingrédients, car les résultats sont obtenus très rapidement.

6.1.2. *Souris C57BL/6 nourrie avec un régime riche en graisse*

La souris *wild-type* C57BL/6 nourrie avec un régime riche en graisse présente l'intérêt d'offrir un modèle plus physiologique du syndrome métabolique, puisque n'étant pas basé, au contraire de la souris db/db, sur une mutation génétique mais plutôt sur l'induction d'une prise de masse grasse consécutive à l'exposition à un régime gras.

Ces souris soumises à un régime riche en graisse développent dès les premières semaines une résistance à l'insuline d'abord hépatique, puis musculaire, avant que le reste des complications liées au surpoids ne surviennent à leur tour (inflammation, stress oxydant, ...) (Turner, N. *et al.* 2013).

Pour nos expérimentations, les animaux âgés de 6 semaines étaient soumis à 16 semaines de régime riche en graisse.

6.1.3. Régimes

Deux régimes de base ont été utilisés pour l'alimentation de nos animaux, un régime riche en graisse correspondant à un régime 260HF (Safe-Diets, France), et un régime standard A03, également fourni par Safe-Diets, avec une adaptation pour les souris db/db qui consistait en un enrichissement en huile de maïs à hauteur de 3%. La composition des régimes est détaillée dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Composition des régimes

	A03	260 HF
Glucides	51,7 %	36,7 %
Protéines	21,4 %	20,0 %
Lipides	5,0 %	36,0 %
Minéraux	5,7 %	4,5 %
Fibres	4,0 %	<0,5 %

6.2. PROCEDURES IN VIVO

6.2.1. *Prise alimentaire, poids et composition corporelle*

Les animaux faisaient l'objet d'une surveillance quotidienne et étaient pesés chaque semaine afin de contrôler leur croissance et l'effet de nos interventions. La prise alimentaire était généralement mesurée chaque semaine, sauf pour les régimes riches en graisse (260HF) nécessitant une conservation au froid, auquel cas ils étaient changés et contrôlés tous les 2 à 3 jours. La composition corporelle était évaluée par imagerie quantitative par résonance magnétique (EchoMRI, Echo Medical Systems, Houston, Texas).

6.2.2. *Estimation de la dépense énergétique par calorimétrie indirecte*

Le volume d'oxygène consommé ($\dot{V}O_2$) et le volume de dioxyde de carbone rejeté ($\dot{V}CO_2$) étaient mesurés chez nos animaux avec un système de cages calorimétriques TSE PhenoMaster/LabMaster (Bad Homburg, Allemagne), à 22°C. La dépense énergétique était calculée en utilisant l'équation de Weir (Weir, J. B. d. V. 1949) à partir des mesures d'échanges gazeux monitorés pour chaque cage à partir de données recueillies toutes les 5 minutes. Le Quotient Respiratoire (Qr) était calculé à partir du rapport $\dot{V}CO_2/\dot{V}O_2$. Les animaux bénéficiaient de 24h d'habituation dans la cage avant le début de la collecte des mesures. Les données étaient ensuite enregistrées pendant 24h.

6.2.3. *Estimation de l'efficacité apparente d'absorption énergétique*

Les selles des souris étaient récoltées par intervalle de 48h jusqu'à obtenir environ 1 gramme d'échantillon par animal, avant d'être pesées précisément, séchées à l'étuve (60°C) pendant 72h puis pesées de nouveau. L'énergie restante dans les selles était évaluée en duplicata à partir d'un échantillon d'environ 300 mg de selles sèches, à partir de mesures de calorimétrie directe fournies par un appareil IKA C200 (IKA, Allemagne), puis normalisée par la production nette de selles par 24h. L'efficacité apparente d'absorption énergétique (EAAE) était définie selon la formule suivante, l'énergie contenue dans les urines étant négligée car considérée comme inférieure à 2% de la balance totale (Moir, L. *et al.* 2011) :

$$EAAE (\%) = \frac{\text{Energie ingérée (kJ/j)} - \text{Energie restante dans les selles (kJ/j)}}{\text{Energie ingérée (kJ/j)}}$$

6.2.4. Mesure de la glycémie

Les mesures de glycémie étaient réalisées en condition nourrie ou à jeun, par un prélèvement d'une goutte de sang à l'extrémité de la queue des animaux. La glycémie était évaluée à l'aide d'un glucomètre Stat Strip Xpress® (Nova Biomedical, Royaume-Uni) disposant d'une plage d'utilisation de 0 à 900 mg/dL.

6.2.5. Test de tolérance intrapéritonéal à l'insuline (ITT)

La glycémie était monitorée chez nos souris à l'aide d'un glucomètre Stat Strip Xpress® (Nova Biomedical, Royaume-Uni), après l'injection intrapéritonéale d'insuline humaine isophane (NPH) et à partir d'un prélèvement de sang réalisé au bout de la queue de l'animal (0,6 µL). Pour les doses et les temps de mesure, se référer aux parties méthodologiques spécifiques de chaque étude.

6.2.6. Test oral de tolérance aux glucides (OGTT)

La glycémie des souris était monitorée chez nos souris à l'aide d'un glucomètre Stat Strip Xpress® (Nova Biomedical, Royaume-Uni), après administration par gavage gastrique de glucides (glucose ou amidon) et à partir d'un prélèvement de sang réalisé au bout de la queue de l'animal (0,6 µL). Pour les doses et les temps de mesure, se référer aux parties méthodologiques spécifiques de chaque étude.

6.3. PROCEDURES EX VIVO

6.3.1. Incubation de muscles

Les muscles soléaires intacts des deux jambes étaient soigneusement disséqués et incubés pendant 30 minutes dans un tampon bicarbonate Krebs-Henseleit (Dardevet, D. *et al.* 2000), dont la composition est décrite dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2 : Composition du tampon Krebs-Henseleit

Composant	Concentration (mM)
NaCl	120
KCl	4,8
NaHCO ₃	25
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄	1,2
Hepes	5
Glucose	5
ABS	0,1%

Une phase gazeuse composée de 95% d'O₂ et 5% de CO₂ était maintenue à la surface du milieu. Après 30 minutes de pré-incubation, les muscles appariés étaient transférés vers un milieu frais de composition identique en présence ou absence de 12 nM d'insuline pour une nouvelle incubation de 30 minutes, avant d'être immédiatement congelés dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C.

6.3.2. Respiration mitochondriale haute résolution sur fibres perméabilisées

6.3.2.1. Préparation des milieux

Dans cette partie sont détaillés les 2 milieux (conservation : BIOPS ; et respiration : MiR05) qui ont été utilisés, ainsi que les réactifs chimiques.

Tableau 3 : Composition du milieu de conservation BIOPS

Solution	Concentration finale (mM)
CaK₂EGTA (Stock 100 mM)	2,77
K₂EGTA (Stock 100 mM)	7,23
Na₂ATP	5,77
MgCl₂.6H₂O	6,56
Taurine	20
Na₂-Phosphocréatine	15
Imidazole	68,1
DTT	0,5
MES hydrate	50

A partir des solutions stock suivantes :

- K₂EGTA 100 mM (100 mM EGTA et 200 mM KOH, pH = 7)
- CaK₂EGTA 100 mM (100 mM EGTA, 200 mM CaCO₃ et 200 mM KOH, pH = 7, dissoudre le carbonate de calcium à 80°C).

Le milieu de conservation BIOPS était aliquoté et conservé à -20°C jusqu'à usage.

Tableau 4 : Composition du milieu de respiration MiR05

Solution	Concentration Stock (mM)
EGTA	0,5
MgCl₂.6H₂O	3
K-lactobionate (Stock 500 mM)	60
Taurine	20
KH₂PO₄	10
HEPES	20
D-Sucrose	110
ASB	1 g/l

A partir de la solution suivante :

- K-lactobionate 500 mM (Acide lactobionique 500 mM, KOH pour ajustement du pH à 7).

Le milieu de respiration MiR05 était aliquoté et conservé à -20°C jusqu'à usage, où il était alors supplémenté avec 20 mM de créatine, le milieu ainsi supplémenté était appelé Mir05Cr.

Tableau 5 : Réactifs

Solution	Concentration stock (mM)	Précaution
Palmitoyl-carnitine	10	Stockage -20°C
Malate	800	Neutraliser avec du 5N KOH. Stocker à -20°C
ADP	500	Neutraliser avec du 5N KOH. Stocker à -80°C
MgCl₂	500	
Pyruvate	2000	Préparer frais
Succinate	1000	
CCCP	1	Dissoudre dans DMSO, stocker à -20°C dans tubes en verre
Roténone	1	Dissoudre dans de l'éthanol, protéger de la lumière
Antimycine A	5	Dissoudre dans de l'éthanol

6.3.2.2. *Traitement des fibres musculaires*

Immédiatement après la mise à mort de l'animal, un morceau de muscle gastrocnémien était prélevé dans sa partie rouge, puis déposé dans un tube contenant 5 mL de milieu de conservation BIOPS placé dans de la glace (Pesta, D. et Gnaiger, E. 2012). La composition est décrite en paragraphe §6.3.2.1 dans le Tableau 3 : Composition du milieu de conservation BIOPS.

De retour au laboratoire, un petit morceau de fibre (maximum 5 mg) était dilacéré pendant un temps standardisé de 4 minutes, à l'aide de 2 pinces fines. La manipulation s'effectuait dans une coupelle posée sur de la glace contenant 1 ou 2 ml de BIOPS.

A l'issue de la dilacération, le paquet de fibres était perméabilisé chimiquement dans 2 ml de solution de saponine (50µg/ml) dissoute dans du BIOPS, sous agitation à 4°C, pendant 30 min. Le paquet de fibres était récupéré et transféré dans un tube neuf contenant 2 ml de solution de respiration MiR05 (composition décrite en paragraphe §6.3.2.1 : Tableau 4 : Composition du milieu de respiration MiR05), pendant 10 mn. Cette opération de rinçage était répétée une fois, puis les fibres étaient séparées en 2 paquets d'environ 1 à 3 mg de fibres mouillées, pesées précisément puis transférées dans les chambres de respirométrie pour analyse en duplicata.

6.3.2.3. Respirométrie haute résolution

Les mesures de respiration mitochondriale sur fibres perméabilisées étaient réalisées sur un Oxygraph-2k (Oroboros, Autriche), dans 2mL de MiRO5Cr (cf. paragraphe §6.3.2.1). Les chambres individuelles étaient oxygénées à 450 nmol.ml^{-1} avec de l'oxygène pur et calibrées avant l'ajout des réactifs et fibres. Un temps de stabilisation était laissé après chaque ajout de réactif ou de fibres dans la chambre, et le plateau de consommation d' O_2 pour chaque condition était enregistré (pour le protocole, voir paragraphe §7.3.4). La consommation résiduelle d'oxygène (ROX) était évaluée après ajout de $2,5\mu\text{M}$ d'antimycine A et cette valeur soustraite de toutes les mesures. L'oxygénation du milieu était maintenue au-dessus de 250 nmol.ml^{-1} par une réoxygénation à l' O_2 pur à chaque fois que la valeur d' O_2 atteignait ce seuil, selon les recommandations de certains auteurs (Pesta, D. et Gnaiger, E. 2012). Le flux d'oxygène pour chaque étape, dans sa phase stable, était normalisé par la masse de tissu mouillé et corrigé par le bruit de fond instrumental.

6.4. DOSAGES BIOCHIMIQUES

6.4.1. Quantification du niveau d'abondance des protéines par western Blot

6.4.1.1. Extraction des protéines

Foie ou muscle gastrocnémien

Environ 50mg de tissu congelé (foie, muscle) étaient pesés précisément et placés dans 20 volumes de tampon NP-40 (Tris HCl 50mM, pH=7.4, NaCl 150 mM, NaF 1mM, Na₃VO₄ 1mM, Nonidet P-40 1%, Sodium deoxycholate 0,25%) en présence d'un cocktail inhibiteur de protéases (1µL pour 100µL de tampon, P8340, Sigma Aldrich) et de tablettes inhibitrices de phosphatases (1 tablette pour 10mL de tampon, #88667 Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis). Les tissus étaient homogénéisés dans la glace au moyen d'un potter en verre, puis incubés 1h à 4°C sous agitation avant d'être centrifugés à 14000 g pendant 10 minutes à 4°C pour récupérer le surnageant. Le contenu en protéines du surnageant était dosé par kit *DC™ Protein Assay* (Bio-Rad, Etats-Unis), selon la méthode décrite en paragraphe §6.4.4.1, puis tous les échantillons étaient ramenés à la même concentration avant d'être dilués une seconde fois dans du tampon Laemmli 2X, puis chauffés pendant 5 minutes à la température conseillée par le fabricant de l'anticorps (cf. Tableau 6 : Anticorps et spécificités méthodologiques).

Muscle soléaire

Pour le muscle soléaire, la quantité de tissu prélevée sur souris étant largement inférieure, le protocole décrit ci-dessus était appliqué avec les modifications suivantes :

Le muscle soléaire congelé entier était pesé précisément et placé dans un tube Ependorf en présence de 20 volumes de tampon NP-40 (Tris HCl 50mM, pH=7.4, NaCl 150 mM, NaF 1mM, Na₃VO₄ 1mM, Nonidet P-40 1%, Sodium deoxycholate 0,25%) en présence d'un cocktail inhibiteur de protéases (1µL pour 100µL de tampon, P8340, Sigma Aldrich) et de tablettes inhibitrices de phosphatases (1 tablette pour 10mL de tampon, #88667 Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis). Le muscle était d'abord lacéré à l'aide d'un petit ciseau avant d'être homogénéisé au moyen d'un micro potter adapté à la forme du tube Ependorf. La suite du protocole était similaire à la description ci-dessus.

Tissu adipeux blanc ou brun

Pour le tissu adipeux, le protocole décrit ci-dessus était appliqué avec les modifications suivantes :

Environ 100mg de tissu adipeux étaient pesés précisément et placés dans 2 volumes de tampon NP-40 (Tris HCl 50mM, pH=7.4, NaCl 150 mM, NaF 1mM, Na₃VO₄ 1mM, Nonidet P-40 1%, Sodium

deoxycholate 0,25%) en présence d'un cocktail inhibiteur de protéases (1µL pour 100µL de tampon, P8340, Sigma Aldrich) et de tablettes inhibitrices de phosphatases (1 tablette pour 10mL de tampon, #88667 Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis). Le tissu était homogénéisé à l'aide d'un Ultra-Turrax (IKA, Allemagne) dans un tube adapté gardé dans de la glace. L'homogénat était laissé à incuber 1h à 4°C sous agitation, avant d'être centrifugé 10 minutes à 4°C à 14000 g. Le mélange présentait alors 3 phases :

- Un culot dur au fond de l'aliquot (débris)
- Une phase liquide au milieu (protéines solubilisées)
- Une phase lipidique en haut (acides gras contenus dans l'adipocyte)

La phase liquide du milieu était prélevée avec précaution en utilisant une seringue avec aiguille 25G, en évitant de remuer le culot et de prélever la phase lipidique. La phase liquide était déposée dans un nouvel aliquot puis centrifugé à nouveau à 4°C pendant 10 minutes à 14000 g. La suite du protocole était similaire à celui des autres tissus décrits plus haut.

Tableau 6 : Anticorps et spécificités méthodologiques

Cible	Marque	Référence	Température de dénaturation des échantillons	Isotype	Concentration utilisée
Akt (pan) (C67E7)	Cell Signaling	#4691	90°C	Rabbit	1:1000 ^e
Akt p (Ser473) (D9E)	Cell Signaling	#4060	90°C	Rabbit	1:1000 ^e
Akt p (thr308)	Cell Signaling	#9275	90°C	Rabbit	1:1000 ^e
AMPKα (D63G4)	Cell Signaling	#5832	90°C	Rabbit	1:1500 ^e
AMPKα p (Thr172) (40H9)	Cell Signaling	#2535	90°C	Rabbit	1:1500 ^e
COX IV (4D11-B3-E8)	Cell Signaling	#11967S	50°C	Mouse	1:1000 ^e
GSK-3β (27C10)	Cell Signaling	#9315S	90°C	Rabbit	1:1000 ^e
GSK-3β p (S9) (D85E12)	Cell Signaling	#5558S	90°C	Rabbit	1:2000 ^e
Glut4 (IF8)	Santa Cruz	sc-53566	50°C	Mouse	1:200 ^e
MFN2 (NIAR164)	Abcam	ab124773	90°C	Rabbit	1:1000 ^e
SAPK/JNK	Cell Signaling	#9252	90°C	Rabbit	1:1000 ^e
SAPK/JNK p (Thr183/Tyr185) (G9)	Cell Signaling	#9255	90°C	Mouse	1:750 ^e
Total OXPHOS	Abcam	ab110413	50°C	Mouse	1:1000 ^e
UCP-1	Abcam	Ab23841	50°C	Rabbit	1:9000 ^e
UCP-2	Biologend	#615901	50°C	Rabbit	1:500 ^e

6.4.1.2. *Blotting*

Pour chaque test, une échelle de poids moléculaire (Precision Plus Protein™ WesternC™ Standard, Bio-Rad, Etats-Unis) et un contrôle interne choisi parmi les échantillons du groupe contrôle de l'étude, étaient déposés à côté de 15 μ g de chaque échantillon sur un gel à gradient en polyacrylamide (4–15% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Gel, Bio-Rad, Etats-Unis). Les protéines migraient sous un courant de 300V pendant 18 à 20 minutes dans un tampon d'électrophorèse (Tris 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1%) avant que les protéines ne soient transférées sur membrane PVDF grâce à un système de transfert semi-liquide (Transblot, Bio-Rad, Etats-Unis) par un courant continu de 25V à 2,5A pendant 7 minutes. Pour les protéines issues de tissu adipeux, une membrane nitrocellulose était utilisée à la place de la membrane PVDF. Pour blocage des sites de fixation aspécifiques, les membranes étaient alors incubées dans un tampon Tween – Tris saline (TTBS : 50 mM Tris base pH: 7,5, 150 mM NaCl, and 0,01% Tween 20) enrichi avec 5% de BSA pendant 1 heure à température ambiante. Les membranes étaient ensuite rincées au TTBS puis incubées pendant la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dirigé

contre la protéine d'intérêt, dilué dans du TTBS + BSA 5% à la concentration décrite dans le Tableau 6 : Anticorps et spécificités méthodologiques. Après l'incubation, les membranes étaient à nouveau lavées 3 fois au TTBS puis exposées à un anticorps secondaire correspondant à l'isotype décrit dans le Tableau 6. La concentration de l'anticorps secondaire était égale à la moitié de celle utilisée pour l'anticorps primaire, et les membranes étaient incubées pendant 1h à température ambiante. Les membranes étaient ensuite lavées 3 fois dans du TTBS avant d'être exposées à une solution de chimioluminescence (Clarity Western ECL; Bio-Rad, Etats-Unis) pendant 1 minute. Les membranes étaient alors scannées sur un système Bio-Rad Chemidoc® et l'intensité des bandes mesurées à l'aide du logiciel d'analyse d'image fourni (ImageLab V4.1, Bio-Rad, Etats-Unis).

6.4.2. Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR

6.4.2.1. Extraction de l'ARN

Afin de réaliser l'extraction des ARN, 50µg de tissus étaient placés dans un tube contenant 1ml de TRIzol® (Thermo Fisher Scientific). L'homogénéisation était réalisée à l'aide d'un appareil de dispersion haute performance Ultra-Turrax®(IKA, Chine) pendant 20 secondes, puis l'homogénat était laissé à incuber pendant 5 minutes à température ambiante, avant d'être transféré dans un tube Eppendorf dans lequel on ajoutait 200µL de chloroforme. Après 15 secondes passées au vortex, l'homogénat reposait pendant 5 minutes à température ambiante avant d'être centrifugé pendant 15mn à 12000 tours/minute, à +4°C. Environ 500µL du surnageant (phase translucide) étaient alors collectés et placés dans un nouveau tube en présence d'un volume égal d'isopropanol. Après un passage au vortex, le mélange était laissé à incuber à -20°C pendant 15 mn pour le foie, 2h pour le muscle et au moins 6h pour le tissu adipeux. Une nouvelle centrifugation pendant 10 mn à 12000 tours/mn à 4°C permettait de précipiter un culot, lequel était récupéré après s'être débarrassé par pipetage de la fraction soluble surnageante.

Afin de sécher la pelote d'ARN, 250 µL d'éthanol préalablement refroidit à +4°C (75% vol.) était ajouté dans le tube, avant une nouvelle centrifugation pendant 5 mn à 12000 tours/mn, à 4°C, l'éthanol était alors éliminé puis on répétait 2 fois de plus cette étape, avec de l'éthanol 75% pour la 1^{ère} répétition, de l'éthanol absolu (lui aussi refroidit à +4°C) pour la dernière. L'éthanol absolu était alors retiré et la pelote d'ARN était laissée sous hotte jusqu'à séchage complet, et moyenne 10 à 15 mn.

Enfin, la pelote était resuspendue dans de l'eau ARNase free (100µL pour les échantillons de foie, 50µL pour les échantillons de muscle et 25 à 30µL pour les échantillons de tissu adipeux blanc) par allers-retours dans le cône de pipette. Dans le cas où la pelote ne se dissolvait pas facilement, l'échantillon pouvait être incubé au bain-marie pendant 10 mn, à 55°C-60°C, avant d'être resuspendu. A ce stade, les échantillons étaient stockés à -80°C.

6.4.2.2. Quantification des ARN

La quantité d'ARN des échantillons était dosée avec un fluorimètre Quantus™ équipé avec un système ARN Quantifluor® (Promega, France), en fonction des instructions fournies avec l'appareil.

6.4.2.3. Rétrotranscription

De l'ADN complémentaire (ADNc) était retranscrit à partir de 2µg d'ARN extrait des échantillons avec un kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit fourni par Applied Biosystem (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis), en fonction des instructions fournies par le fabricant.

Brièvement, les ARN extraits étaient mélangés avec un volume égal de mélange « master mix » de rétrotranscription contenant les composants décrits dans le tableau ci-dessous, basé sur les indications du manuel du fournisseur (exemple pour un volume final de mélange réactionnel de 10µL) :

Tableau 7 : Composition du master mix de rétrotranscription

Composant	Volume (µL)
Tampon 10X Reverse Transcript	2
25X dNTP (100mM)	0,8
10X Reverse Transcript Random Primers	2
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1
Inhibiteur d'ARNase	0,5
H₂O ARNase-free	3,7
Total par réaction	10

Le mélange master mix + ARN était alors incubé dans un thermocycleur CFX connect™ Real-time system (Bio-Rad, Etats-Unis) pendant 10 minutes à 25°C, puis 120 minutes à 37°C, puis 5 minutes à 85°C, avant de se redescendre à 4°C. Cette étape catalyse ainsi la rétrotranscription d'ADNc, qui était conservé à -20°C avant l'étape suivante

6.4.2.4. Mesure quantitative de la réaction en chaîne par polymérase en temps réel

Les échantillons d'ADNc étaient dilués dans 8 volumes d'eau ARNase-free, puis mis en présence du mélange pour la réaction en chaîne par polymérase et d'une sonde Taqman (Applied Biosystems, Australia) conçue de sorte à s'hybrider avec une région d'ADN spécifique amplifiée par une paire de d'amorces spécifiques, tel que décrit dans le tableau ci-dessous (exemple pour un dépôt de 9,5 µL en duplicata) :

Tableau 8 : Composition du mix pour la réaction en chaîne par polymérase

Composant	Volume (µL)
ADNc dilué	10
Sonde (cf. Tableau 9 : Sondes Taqman utilisées)	1
Master Mix	10

Tableau 9 : Sondes Taqman utilisées

Gène ciblé	Référence
Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH)	Mm99999915_g1
Mitochondrial transcription factor A (TFam)	Mm00447485_m1
Nuclear respiratory factor 1 (NRF1)	Mm01135606_m1
Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (Ppar-α)	Mm00440939_m1
Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (Ppar-γ)	Mm00440940_m1
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1-α)	Mm01208835_m1

La réaction en chaîne par polymérase était initiée dans un thermocycleur CFX connect™ Real-time system (Bio-Rad, Etats-Unis) par 2 minutes d'activation des enzymes à 50°C, 10 minutes de dénaturation suivies d'une minute d'élongation. 40 cycles étaient réalisés en tout. L'expression des ARNm était alors estimée avec la méthode par comparaison des cycles de transcription ($\Delta\Delta Ct$). L'expression génique était normalisée en utilisant GAPDH comme gène de ménage, les données sont présentées en utilisant leur valeur Rq normalisée par le groupe contrôle, définie telle que :

$$Rq = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\text{Avec : } \Delta Ct = Ct (\text{gène cible}) - Ct (GAPDH)$$

$$\text{Et : } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{échantillon}) - \Delta Ct (\text{moyenne groupe contrôle})$$

6.4.3. Activités enzymatiques

Environ 25 mg de tissu (muscle, foie) congelé étaient homogénéisés mécaniquement dans un potter en verre dans 20 volumes de tampon (KCl 175 mM, EDTA 2 mM et Triton 100X 0,1% ; pH: 7,4), soumis à 3 cycles de congélation-décongélation, afin d'opérer un éclatement mécanique de la membrane mitochondriale (Stephenson, E. J. *et al.* 2012) avant d'être redilués dans 4 volumes de ce même tampon. Les échantillons étaient alors congelés à -80°C jusqu'à utilisation.

6.4.3.1. Citrate Synthase (CS)

Ce protocole est adapté de la méthode mise au point par Srere (Srere, P. A. 1969).

Un tampon de réaction enzymatique était préparé tel que décrit dans le tableau ci-dessous, ici un exemple pour environ 20 mL de tampon (soit la quantité nécessaire pour une plaque 96 puits complète) :

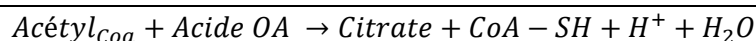
Tableau 10 : tampon de réaction enzymatique CS

Solution	Diluant	Concentration mère	Volume final
Tris-HCl ; pH 8,1	H ₂ O	72,5 mM	19,005 mL
Acétyl-CoA	H ₂ O	30 mM	210 µL
DTNB	Ethanol	1 mM	210 µL
Remarque : la solution de DTNB est sensible à la lumière.			

Cinq microlitres d'échantillon préparé comme indiqué plus haut étaient déposés en duplicata sur une plaque 96 puits (300 µL, fond plat) en présence de 185 µL du tampon décrit dans le Tableau 10. Puis une cinétique d'absorbance à 412 nm correspondant au bruit de fond expérimental était enregistrée pendant 3 minutes, appelée Act_{bruit}.

10 µL d'une solution d'acide Oxaloacétique (OA, 10 mM, dissout dans du buffer Tris-HCl) étaient ajoutés dans tous les puits rapidement à l'aide d'une pipette multicanaux, afin de déclencher la réaction enzymatique dans tous les puits en même temps.

L'enzyme CS catalyse la réaction entre l'acétyl-CoA et l'acide OA pour former de l'acide citrique. Le produit de cette réaction résulte en la formation de CoA avec un groupement thiol, lequel réagit avec le DTNB présent pour former de l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB) de couleur jaune, quantifiable en mesurant l'absorbance à 412 nm.



Une nouvelle cinétique d'absorbance était ainsi enregistrée appelée activité totale (Act_{totale}) immédiatement après ajout de l'acide OA, et l'activité nette (Act_{nette}) de la CS était calculée telle que, en µmoles/min :

$$Act_{nette} = Act_{totale} - Act_{bruit}$$

$$\text{Avec : } Act = \frac{m \cdot V \cdot dil}{\epsilon^{nm} \cdot L}$$

Et :

m (unité par minute)	=	pente de la droite de la cinétique d'absorbance (en unité par minute)
V (mL)	=	volume total de la réaction (ici : 0,2 mL)
ϵ^{mM} (mM ⁻¹ .cm ⁻¹)	=	coefficient d'extinction du TNB à 412 nm (ici : 13,6)
L (cm)	=	longueur d'onde pour la mesure d'absorbance (ici : 0,552)

La valeur nette d'activité de CS est normalisée par rapport à la quantité de muscle mouillé (w.t.) présente, ou à la quantité de protéines totales (cf. paragraphe § 6.4.4.1 : *Protéines totales*) injectée dans un micro-puits. Les données finales sont exprimées en nmol.mn⁻¹.

6.4.3.2. *β-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (β-HAD)*

Un tampon de réaction enzymatique était préparé tel que décrit dans le tableau ci-dessous, ici un exemple pour environ 7 ml de tampon (soit la quantité nécessaire pour un tiers de plaque 96 puits, soit 16 échantillons en duplicata) :

Tableau 11 : tampon de réaction enzymatique β-HAD

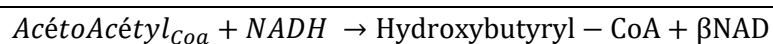
Solution	Diluant	Concentration mère	Volume final
Tris-HCl – EDTA, pH 7	H ₂ O	50 mM – 2mM	7 mL
NADH, forme réduite, dissodium salt	Tris HCl - EDTA	10 mM	186,2 µL
A préparer frais !			

Cinq microlitres d'échantillon préparé comme indiqué plus haut étaient déposés en duplicata sur une plaque 96 puits (300 µL, fond plat) en présence de 185 µL du tampon décrit dans le Tableau 11. Puis une cinétique d'absorbance à 355 nm correspondant au bruit de fond expérimental était enregistrée pendant 3 minutes, appelée Act_{bruit}.

Dix microlitres d'une solution d'acétoacétyl CoA (2 mM, dissout dans de l'eau) étaient ajoutés dans tous les puits rapidement à l'aide d'une pipette multicanaux, afin de déclencher la réaction enzymatique dans tous les puits en même temps.

Attention : la réaction est sensible à la concentration d'acétoacétyl CoA injectée, il est ainsi préférable de travailler avec une pipette P10 dans un souci de reproductibilité.

L'enzyme β-HAD catalyse la réaction entre l'acétoacétyl-CoA et le NADH pour former du β-Hydroxybutyryl-CoA + β-NAD.



La disparition du NADH est mesurée à une longueur d'ondes de 355 nm lors d'une nouvelle cinétique d'absorbance appelée Act_{totale} immédiatement après ajout de l'acétoacétyl-CoA. L'activité nette (Act_{nette}) de la β -HAD était calculée telle que, en $\mu\text{moles}/\text{min}$:

$$Act_{\text{nette}} = Act_{\text{totale}} - Act_{\text{bruit}}$$

$$\text{Avec : } Act = \frac{m \cdot V \cdot dil}{\epsilon \cdot nm \cdot L}$$

Et :

m (unité par minute)	=	<i> pente de la droite de la cinétique d'absorbance (en unité par minute)</i>
V (mL)	=	<i> volume total de la réaction (ici : 0,2 mL)</i>
ϵ^{mM} ($mM^{-1} \cdot cm^{-1}$)	=	<i> coefficient d'extinction du NADH à 355 nm (ici : 6,22)</i>
L (cm)	=	<i> longueur d'onde pour la mesure d'absorbance (ici : 0,552)</i>

La valeur nette d'activité de β -HAD est normalisée par rapport à la quantité de muscle mouillé (w.t.) présente, ou à la quantité de protéines totales (cf. paragraphe § 6.4.4.1 : *Protéines totales*) injectée dans un micro-puits. Les données finales sont exprimées en $\text{nmol} \cdot \text{mn}^{-1}$.

6.4.4. Dosages colorimétriques

6.4.4.1. Protéines totales

Le contenu en protéines totales des homogénats de tissus était évalué grâce à un kit *DC™ Protein Assay* (Bio-Rad, Etats-Unis), adapté de la méthode de Lowry (Lowry, O. H. *et al.* 1951). Une gamme étalon était préparée à partir d'albumine de sérum bovin (ASB) diluée dans de l'eau et la lecture de l'absorbance était réalisée à 750 nm grâce à un spectrophotomètre PowerWave XS2 (BioTek, Etats-Unis), et le logiciel Gen5 (BioTek, Etats-Unis). Les échantillons étaient déposés en duplicata et ceux dont le coefficient de variation excédait 10% étaient dosés à nouveau.

6.4.4.2. Insuline

Les taux d'insuline plasmatique des souris étaient évalués à l'aide d'un kit *Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA* (Référence #80-INSMSU-E01, Alpco Diagnostics, Etats-Unis), selon les instructions du manuel. Les échantillons de plasma étaient déposés en duplicata, sur une plaque 96 puits enduite d'un anticorps monoclonal ciblant spécifiquement l'insuline. Un détecteur d'anticorps monoclonal secondaire marqué à la peroxydase de raifort (HRP) est alors ajouté. Après un temps d'incubation, la plaque de microtitration est lavée afin d'éliminer les anticorps non liés marqués à l'enzyme. Une solution tétraméthylbenzidine (TMB)- H_2O_2 est ajoutée et incubée, générant une couleur directement proportionnelle à la concentration d'insuline dans l'échantillon d'origine. La réaction est arrêtée avec

un acide et la plaque de microtitration est lue par spectrophotométrie à 450 nm grâce à un PowerWave XS2 (BioTek, Etats-Unis), et le logiciel Gen5 (BioTek, Etats-Unis). Le kit était calibré grâce à une dilution en série d'une solution d'insuline standard. Les échantillons dupliqués dont le coefficient de variation excédait 20% étaient dosés à nouveau.

6.4.4.3. Acides Gras Non Estérifiés

Les taux d'acides gras non estérifiés (AGNE) étaient évalués selon la méthode développée par Wako (kit NEFA-HR 2, Wako, Allemagne), selon le protocole préconisé par le fabricant. Quatre microlitres d'échantillon de plasma dilué ou non étaient déposés sur une plaque 96 puits avant ajout des réactifs. Le kit met en jeu la réaction de l'Acyl-CoA synthétase qui en présence de coenzyme A et d'ATP, transforme les AGNE en Acyl-CoA, AMP et acide pyrophosphorique. Grâce à l'Acyl-CoA oxydase, l'Acyl-CoA obtenu est oxydé et libère du 2,3-trans-Enoyl-CoA et du H₂O₂. Ce dernier est transformé en un pigment bleu-violet par condensation oxydative avec la 3-Méthyl-N-Ethyl-(β-Hydroxéthyl)-Aniline et la 4-amino-antipyrine, en présence de peroxydase. L'absorbance en 2 points (546 nm et 660 nm) était mesurée après 10 mn d'incubation à 37°C nm grâce à un spectrophotomètre PowerWave XS2 (BioTek, Etats-Unis), et le logiciel Gen5 (BioTek, Etats-Unis). Le kit était calibré avec une dilution en série d'une solution standard fournie. Les échantillons dupliqués dont le coefficient de variation excédait 20% étaient dosés à nouveau.

6.4.4.4. Triglycérides plasmatiques

Les taux de triglycérides plasmatiques des souris étaient évalués à l'aide d'un kit *Triglycerides Enzymatic Assay* fourni par MaxDiscovery (référence #5603-01, Bio Scientific Corporation, Etats-Unis), selon les instructions du manuel. Les échantillons de plasma étaient dilués dans du tampon PBS (NaCl 137 mM ; KCl 2,7 mM ; Na₂HPO₄ 10mM et KH₂PO₄ 1,76 mM) à raison de 1:1 et déposés en duplicata. L'absorbance était lue à 520 nm grâce à un spectrophotomètre PowerWave XS2 (BioTek, Etats-Unis), et le logiciel Gen5 (BioTek, Etats-Unis). Le kit était calibré grâce à une dilution en série d'une solution standard de triglycérides. Les échantillons dupliqués dont le coefficient de variation excédait 20% étaient dosés à nouveau.

6.4.4.5. Triglycérides hépatiques

Le contenu en triglycérides hépatiques des souris était évalué à l'aide d'un kit colorimétrique pour triglycérides (référence #K622-100, Biovision Inc., Etats-Unis), selon les instructions du manuel. Cent mg de foie congelé étaient homogénéisés dans 1mL de tampon composé de 5% de Nonidet P40 dans de l'eau. Afin de solubiliser les triglycérides présents, les échantillons subissaient 2 cycles de chauffage à 90°C pendant 2 à 5 minutes suivi d'un refroidissement à température ambiante avant d'être centrifugés à 2000g pendant 2 minutes à température ambiante. Le surnageant était prélevé et dilué

10 fois avec de l'eau. Quinze microlitres d'homogénat étaient déposés sur une plaque 96 puits en duplicata, et le volume total de chaque puits était alors ajusté à 50µL avec le tampon fournit par le fabricant. Après ajout des réactifs, l'absorbance était lue à 570 nm grâce à un spectrophotomètre PowerWave XS2 (BioTek, Etats-Unis), et le logiciel Gen5 (BioTek, Etats-Unis). Le kit était calibré grâce à une dilution en série d'une solution standard de triglycérides. Les échantillons dupliqués dont le coefficient de variation excédait 20% étaient dosés à nouveau.

6.4.4.6. Cholestérol total

Les taux de cholestérol plasmatiques des souris étaient évalués à l'aide d'un kit *Cholesterol Enzymatic Assay* fournit par MaxDiscovery (référence #3460-06, Bio Scientific Corporation, Etats-Unis), selon les instructions du manuel. Les échantillons de plasma étaient dilués dans du tampon PBS à raison de 1:1 et déposés en duplicata. Les esters de cholestérol sont convertis dans un premier temps en cholestérol et acides gras grâce à la présence d'une enzyme. Le cholestérol est alors oxydé pour former du cholesten-3-one + H₂O₂, lequel réagit avec du 4-aminoantipyrine et de l'acide 4-hydroxybenzoïque (PHBS) pour produire de la quinonéimine, de couleur rouge. L'absorbance était lue à 520 nm grâce à un spectrophotomètre PowerWave XS2 (BioTek, Etats-Unis), et le logiciel Gen5 (BioTek, Etats-Unis). Le kit était calibré grâce à une dilution en série d'une solution de cholestérol standard (200mg/dl). Les échantillons dupliqués dont le coefficient de variation excédait 20% étaient dosés à nouveau.

6.4.4.7. Cholestérol LDL

Les taux de cholestérol LDL plasmatiques étaient évalués à l'aide d'un kit *Mouse LDL-cholesterol* fournit par Crystal Chem (référence #79980, Crystal Chem, Etats-Unis), selon les instructions du manuel. Les échantillons de plasma étaient dosés purs. Les fractions LDL, VLDL et chylomicrons présentes dans l'échantillon réagissent avec une solution d'acide sulfonique polyvinyle et d'éther de glycol polyéthylène, résultant en l'inaccessibilité de ces fractions tandis que le cholestérol HDL réagit avec le cocktail enzymatique présent pour former du H₂O₂ lequel est quantifié par réaction de Trinder dans une 1^{ère} mesure. L'ajout d'un détergent spécifique permet de relarguer le cholestérol LDL du complexe acide sulfonique polyvinyle - éther de glycol polyéthylène, permettant à cette fraction de réagir à son tour avec l'enzyme présente pour produire à nouveau du H₂O₂. Ce dernier est quantifié à nouveau et soustrait de la mesure précédente afin d'estimer les niveaux de cholestérol LDL. Le changement d'absorbance suite à l'ajout du dernier réactif était mesure à 600 nm grâce à un spectrophotomètre PowerWave XS2 (BioTek, Etats-Unis), et le logiciel Gen5 (BioTek, Etats-Unis). Le kit était calibré grâce à une dilution en série d'une solution de cholestérol LDL standard. Les échantillons dupliqués dont le coefficient de variation excédait 20% étaient dosés à nouveau.

6.4.4.8. Cholestérol HDL

Les taux de cholestérol HDL plasmatiques étaient évalués à l'aide d'un kit *Mouse HDL-cholesterol* fournit par Crystal Chem (référence #79990, Crystal Chem Inc., Etats-Unis), selon les instructions du manuel. Les échantillons de plasma étaient dosés purs. Les fractions non HDL (LDL, VLDL et chylomicrons) présentes dans l'échantillon réagissent avec une solution d'acide sulfonique polyvinyle et d'éther de glycol polyéthylène, résultant en l'inaccessibilité de ces fractions tandis que le cholestérol HDL réagit avec le cocktail enzymatique présent pour former du H₂O₂, lequel est quantifié par réaction de Trinder. Le changement d'absorbance suite à l'ajout du dernier réactif était mesuré à 600 nm grâce à un spectrophotomètre PowerWave XS2 (BioTek, Etats-Unis), et le logiciel Gen5 (BioTek, Etats-Unis). Le kit était calibré grâce à une dilution en série d'une solution de cholestérol HDL standard. Les échantillons dupliqués dont le coefficient de variation excédait 20% étaient dosés à nouveau.

6.4.4.9. Hémoglobine glyquée

Les taux de d'hémoglobine glyquée (HbA_{1c}) étaient évalués à l'aide d'un kit *Hemoglobin A1c assay* fournit par Crystal Chem (référence #80310, Crystal Chem Inc., Etats-Unis), selon les instructions du manuel. Le dosage s'effectuait sur sang total additionné de 1µl d'EDTA 0,1M pour 20µL de sang total, afin d'éviter la coagulation. Les échantillons étaient soumis à une digestion extensive par une protéase, ce qui entraînait un relargage d'acides aminés dont des valines glyquées provenant des chaînes d'hémoglobine bêta. Ces valines glyquées servaient ensuite de substrats pour une oxydase spécifique pour la fructosyl-valine. Cette enzyme clive spécifiquement les valines terminal-N produisant ainsi du H₂O₂ de manière proportionnelle à la quantité d'hémoglobine glyquée présente. Le changement d'absorbance suite à l'ajout du dernier réactif était mesuré à 700 nm grâce à un spectrophotomètre PowerWave XS2 (BioTek, Etats-Unis), et le logiciel Gen5 (BioTek, Etats-Unis). Le kit était calibré grâce à deux solutions de HbA_{1c} standard. Les échantillons dupliqués dont le coefficient de variation excédait 20% étaient dosés à nouveau.

6.5. STATISTIQUES

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm erreur standard à la moyenne (SEM).

Les analyses statistiques étaient réalisées à l'aide du logiciel Prism V6 et V7 (GraphPad software, USA). La normalité des valeurs était contrôlée par le test de Kolmogorov-Smirnov et l'homogénéité des variances était déterminée avec le F-Test de Bartlett. Quand les deux conditions de normalité et d'homogénéité des variances étaient respectées, les groupes étaient comparés entre eux par un test t de Student pour échantillons non appariés (2 groupes à comparer) ou, lorsqu'il y avait plus de 2 groupes à comparer, une ANOVA à une, deux ou trois voies. Lorsque les données à comparer étaient réparties sur plusieurs temps de mesure, une ANOVA à mesures répétées était appliquée.

Un test post-hoc de Tukey était réalisé lorsque l'ANOVA s'avérait significative. Lorsque seul l'effet groupe était significatif, un test post-hoc de Newman-Keuls ou de Bonferroni par colonne était appliqué. Quand l'homogénéité des variances n'était pas respectée, l'ANOVA était appliquée avec la correction de Greenhouse-Geisser. Quand les conditions de normalité n'étaient pas respectées, un test de Kruskal-Wallis était appliqué à la place de l'ANOVA, avec un test post-hoc de Dunn lorsque le seuil de significativité était atteint.

Le seuil de significativité était fixé à $p < 0,05$.

7. ETUDE 1 :

**EFFETS DE DEUX PROGRAMMES D'ENTRAINEMENT SUR LE CONTROLE
GLYCEMIQUE ET LA FONCTION MITOCHONDRIALE DU MUSCLE
SQUELETTIQUE DE JEUNES SOURIS DB/DB**

7.1. PREAMBULE

Cette première étude a fait l'objet d'une publication dans la revue *Scientific Reports* en mars 2016, l'article est intégralement disponible en annexe dans sa version originale. Ce qui suit est une traduction en langue Française dudit article.

7.2. INTRODUCTION

L'activité physique apparaît comme une stratégie efficace pour la prévention mais également le traitement du DT2 (Sanz, C. *et al.* 2010). De nombreuses études ont démontré l'effet bénéfiques des interventions basées sur l'activité physique pour améliorer la sensibilité à l'insuline, la tolérance au glucose et le contrôle glucidique à long terme (Avery, L. *et al.* 2012; Roberts, C. K. *et al.* 2013; Umpierre, D. *et al.* 2013). Les recommandations actuelles en terme d'exercice pour les patients diabétiques sont de l'ordre de 150 mn d'exercice modéré à vigoureux par semaine (A.D.A. 2004). Cependant, l'adhérence à long terme des individus aux protocoles d'activité physique reste problématique (Chen, Y. *et al.* 2015). De plus, de récents travaux ont montré un phénomène de résistance aux effets bénéfiques de l'activité physique chez certains patients (Stephens, N. A. et Sparks, L. M. 2015). Ainsi, l'identification de modalités d'activité physique présentant une meilleure adhérence et/ou efficacité apparaît comme un défi majeur pour améliorer les bénéfices sur la santé des patients atteints de DT2.

Il a été démontré que l'adhérence des patients à l'activité physique était globalement meilleure pour l'entraînement intermittent de haute intensité (*High Intensity Interval Training*, HIIT) (Jung, M. E. *et al.* 2015; Kong, Z. *et al.* 2016), et de nombreuses études récentes ont également montré des améliorations sur le contrôle glycémique consécutif à un HIIT (Trapp, E. G. *et al.* 2008; Gillen, J. B. *et al.* 2012; Shaban, N. *et al.* 2014; Fex, A. *et al.* 2015; Francois, M. E. et Little, J. P. 2015; Madsen, S. M. *et al.* 2015; Marcinko, K. *et al.* 2015; Cassidy, S. *et al.* 2016; Denou, E. *et al.* 2016; Steckling, F. M. *et al.* 2016). Les effets du HIIT sur la glycémie pourraient être en partie dus à l'amélioration de la fonction mitochondriale musculosquelettique, ainsi que l'ont suggéré certains auteurs (Little, J. P. *et al.* 2011). En effet, le HIIT semble être un puissant activateur de la biogénèse mitochondriale, potentiellement via la stimulation de l'expression de PGC1- α (Little, J. P. *et al.* 2011; Gibala, M. J. *et al.* 2012; Hoshino, D. *et al.* 2013; Cochran, A. J. *et al.* 2014). En outre, la dysfonction mitochondriale semble liée à la résistance à l'insuline (Szendroedi, J. *et al.* 2011). Ainsi, améliorer la fonction mitochondriale pourrait participer à lever l'inhibition sur la voie de signalisation de l'insuline, caractéristique du DT2 (Hesselink, M. K. *et al.* 2016).

A ce jour, aucune étude n'a comparé les effets du HIIT avec ceux d'un entraînement continu à intensité modéré (*Moderate Intensity Continuous Training*, MICT), plus traditionnel, sur les adaptations mitochondriales musculosquelettiques dans un contexte de DT2. Ainsi, l'objectif de ce travail était de comparer les effets de 10 semaines d'HIIT et de MICT sur l'homéostasie glucidique, la voie de signalisation de l'insuline et la fonction mitochondriale de souris diabétiques. Notre hypothèse était

que l'entraînement de type HIIT aurait de plus grands bénéfices sur le contrôle glycémique en raison d'amélioration plus marquée de la fonction mitochondriale.

7.3. MATERIEL ET METHODES

7.3.1. Animaux

Trente souris db/db mâles âgées de 5 semaines ont été sélectionnées pour l'étude parmi 46 souris, à l'issue d'un test initial de course sur tapis roulant. Les caractéristiques des animaux, de leurs conditions d'hébergement et de leurs régimes sont décrites en paragraphe §6.1. Après une semaine d'acclimatation, les animaux ainsi sélectionnés étaient répartis dans les groupes contrôle (CON), MICT ou HIIT. Après 10 semaines d'entraînement, les animaux étaient mis à jeun pour la nuit puis mis à mort par décapitation, avant dissection.

7.3.1.1. Test de performance

Le protocole de test de performance était adapté de précédents travaux (Kemi, O. J. *et al.* 2002; Lee, S. *et al.* 2011; Ostler, J. E. *et al.* 2014), avec les adaptations suivantes :

Les souris du groupe MICT étaient placées sur le tapis roulant et s'échauffaient pendant 5 minutes à une vitesse de 6 m/mn. La vitesse était ensuite augmentée par paliers de 2 m/mn toutes les 2 minutes jusqu'à ce que la souris ne soit plus capable de continuer malgré une stimulation légère à l'aide d'une baguette en bois. Les souris du groupe HIIT réalisaient un test de performance sur un tapis roulant avec une pente de +20°. Les tests de performances avaient lieu au début du protocole et après 5 semaines d'entraînement afin de réajuster l'intensité de celui-ci.

7.3.1.2. Entraînement

Les protocoles d'exercice chroniques étaient adaptés de précédents travaux (Stolen, T. O. *et al.* 2009; Lee, S. *et al.* 2011; Ostler, J. E. *et al.* 2014), avec les modifications suivantes (cf. Figure 15 : Design de l'étude 1) :

Les souris du groupe MICT courraient pendant 80 mn à une intensité correspondant à 50-60% (pente : 0°) de la vitesse maximale atteinte lors du dernier test de performance réalisé. Les souris du groupe HIIT réalisaient un entraînement intermittent à haute intensité qui consistait en 13 séries de 4 mn de course en pente (+20°) à une intensité correspondant à 85-90% de la vitesse maximum atteinte lors du dernier test de performance à +20° en date. Les séries d'exercice étaient séparées par des périodes de repos de 2 mn.

Pour permettre l'habituation des animaux, l'intensité de l'exercice était graduellement augmentée sur les trois premières semaines sur pente nulle, ou à +20°, dans le but d'atteindre les objectifs décrits plus

haut. Les souris des deux groupes étaient exposées à 10 semaines d'entraînement à raison de 5 sessions par semaine.

7.3.2. Procédures in vivo

7.3.2.1. Composition corporelle

La masse maigre et la masse grasse étaient évaluées en début et fin de protocole, selon la méthode décrite en paragraphe §6.2.1.

7.3.2.2. Test de tolérance à l'amidon et à l'insuline.

Les tests étaient réalisés en fin de protocole selon les méthodes décrites en paragraphe §6.2.5 et §6.2.6. La glycémie était monitorée pendant les 2 heures suivant une injection intrapéritonéale d'insuline (2 U/kg de poids de corps) ou un gavage oral d'une solution d'amidon de maïs (3g/kg de poids de corps) sur les souris préalablement mises à jeun sur la nuit. La glycémie était mesurée avant intervention, puis 30, 60, 90 et 120 minutes après.

7.3.3. Collecte du sang et paramètres sériques

Le sang total était recueilli immédiatement après la mise à mort de la souris et une petite portion destinée au dosage d'HbA_{1c} (20µL) était collectée dans un tube traité avec 1µL d'EDTA (0,1), puis laissée dans de la glace jusqu'à analyse. Le reste du sang était collecté dans un tube sec et laissé à coaguler à température ambiante pendant 45 mn avant d'être centrifugé pendant 10 mn à 2000g. Le sérum surnageant était alors pipeté et congelé à -80°C jusqu'à analyse.

L'insuline sérique et le taux d'HbA_{1c} étaient mesurés selon les méthodes décrites respectivement en paragraphe §6.4.4.2 et paragraphe §6.4.4.9.

7.3.4. Incubations de muscles

Les muscles soléaires intacts des deux jambes étaient soigneusement disséqués et incubés selon la méthode décrite en paragraphe §6.3.1 : Incubation de muscles, en présence ou absence de 12 nM d'insuline.

7.3.5. Activités enzymatiques

Vingt-cinq mg de muscle gastrocnémien étaient homogénéisés dans 20 volumes de buffer, tel que décrit en paragraphe §6.4.3, afin d'évaluer l'activité des enzymes CS et β -HAD, selon le protocole décrit en paragraphe §6.4.3.

7.3.6. Respiration mitochondriale sur fibres perméabilisées

La respirométrie haute résolution était réalisée dans un Oxygraph-2k (Oroboros, Autriche) sur une petite portion de fibres de gastrocnémien, perméabilisées selon la méthode décrite en paragraphe §6.3.2.2.

Après calibration, oxygénation et stabilisation du signal, du palmitoyl-carnitine (0,02 mM) et du malate (2 mM) étaient ajoutés dans les chambres. Le paquet de fibres perméabilisé était alors ajouté et le plateau de consommation d'O₂ en absence de stimulation par l'ADP, appelé *leak state* était enregistré. 2,5 mM d'ADP et 1,5 mM de MgCl₂ étaient alors ajoutés dans la chambre pour la mesure de respiration maximale stimulée par un acide gras. Le reste du protocole consistait en l'enregistrement séquentiel du plateau de consommation d'O₂ pour :

- Complexe I : (addition de 5 mM de pyruvate)
- Complexe I + II (addition de 10 mM de succinate)
- Complexe II (addition de 0,5 µM de roténone)
- Complexe II découplé (ajouts successifs de paliers de 0,05 µM de CCCP jusqu'à ce que le plateau de consommation d'O₂ soit atteint)
- Consommation résiduelle (addition de 2,5 µM d'antimycine)

La température était maintenue à +37°C. Le protocole détaillé et la composition des milieux utilisés est disponible en paragraphe §6.3.2.

7.3.7. Western-Blot

Les protéines des muscles soléaires et gastrocnémien étaient extraites selon le protocole décrit en paragraphe §6.4.1.1. Pour le western blot, 15 µg de protéines étaient déposées. Le protocole et les spécificités des anticorps sont décrits en paragraphe §6.4.1 : Quantification du niveau d'abondance des protéines par western Blot.

7.3.8. Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR

Le protocole complet ainsi que le détail des sondes utilisées est décrit dans la méthodologie générale en paragraphe §6.4.2 : Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR.

7.3.9. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± erreur standard à la moyenne. Le détail du choix des tests statistiques est explicité en paragraphe §6.5: Statistiques.

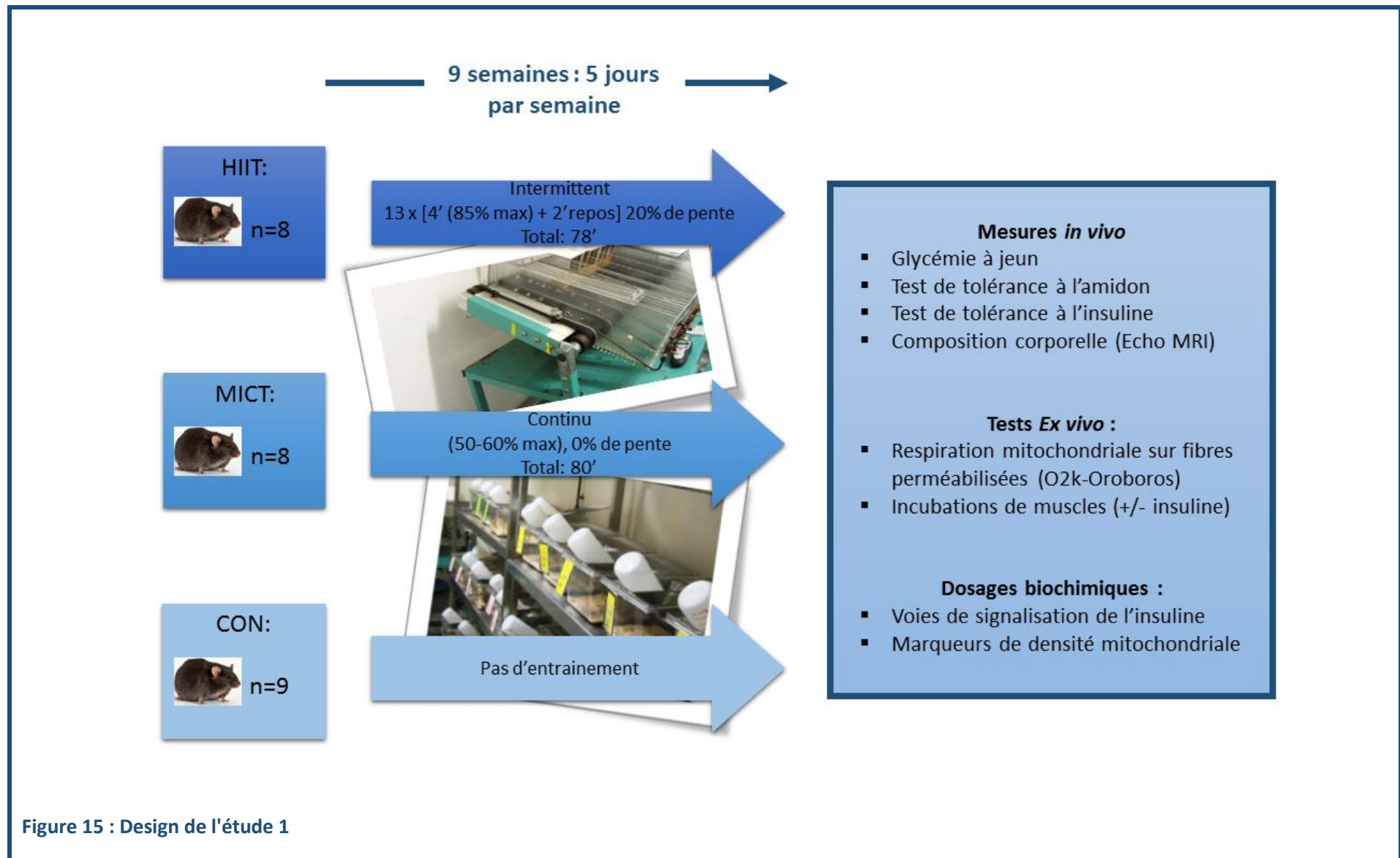


Figure 15 : Design de l'étude 1

7.4. RESULTATS

7.4.1. Composition corporelle

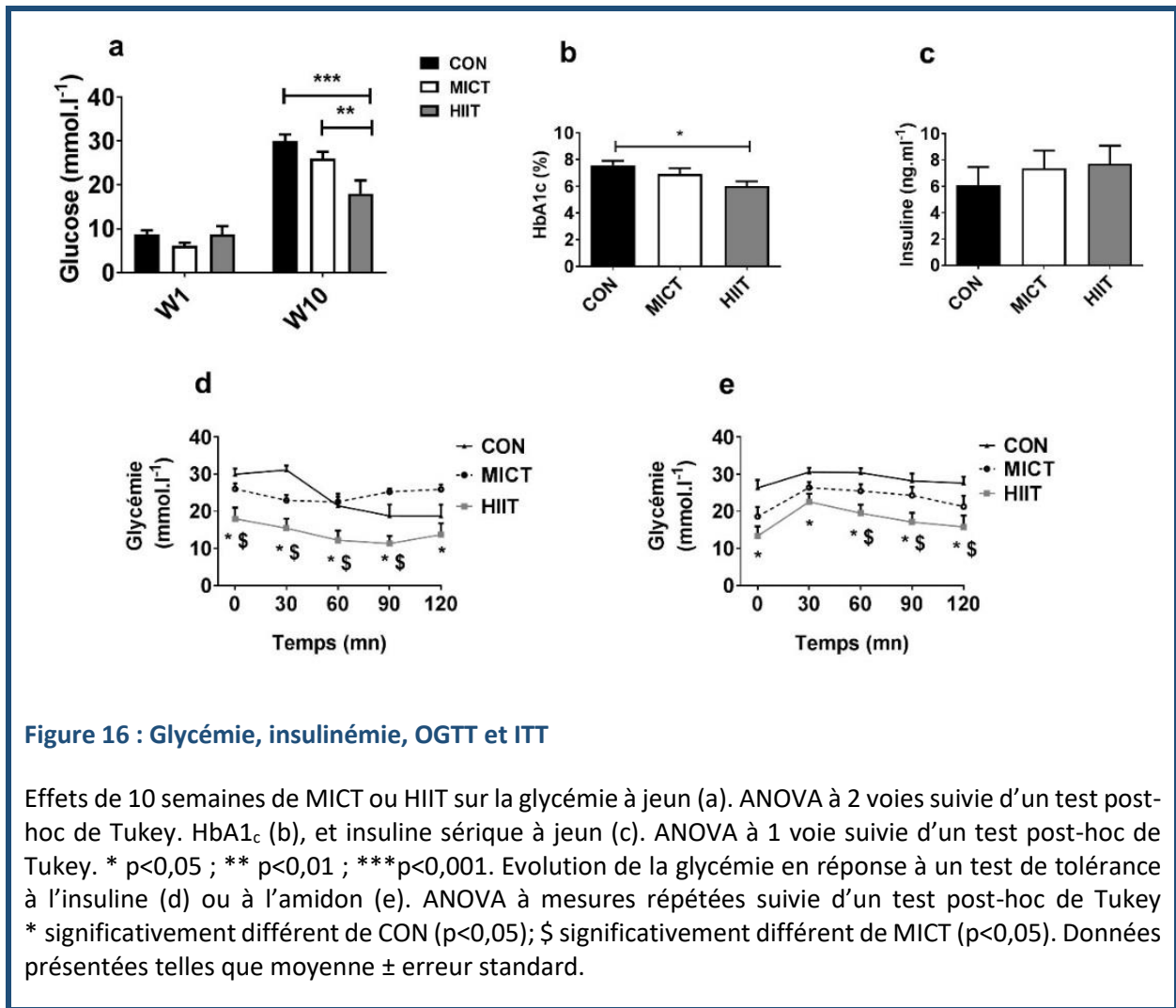
Aucun effet significatif de l'entraînement n'a été mis en évidence que ce soit sur le poids corporel, la masse grasse ou maigre en comparaison à CON (cf. Tableau 12 : Caractéristiques des souris avant et après entraînement).

Tableau 12 : Caractéristiques des souris avant et après entraînement

	CON	MICT	HIIT	p (ANOVA)
N=	9	8	8	
Poids corporel, semaine 1 (g)	39,89 ± 0,79	39,04 ± 1,43	35,19 ± 3,19	0,232
Masse grasse, semaine 1 (%)	47,46 ± 0,76	46,48 ± 0,74	48,96 ± 0,50	0,060
Masse grasse, semaine 10 (%)	52,96 ± 0,78	53,11 ± 0,75	48,14 ± 4,31	0,920
Masse maigre, semaine 1 (%)	49,66 ± 0,74	50,81 ± 0,97	48,67 ± 0,54	0,250
Masse maigre, semaine 10 (%)	44,91 ± 0,62	44,95 ± 0,66	50,27 ± 4,18	0,710
Masse du foie (g)	1,70 ± 0,09	1,68 ± 0,07	1,48 ± 0,07	0,093
Masse du foie (%)	4,27 ± 0,19	4,35 ± 0,25	4,54 ± 0,06	0,875
Masse du gastrocnémien (mg)	51,75 ± 2,80	51,50 ± 3,58	49,87 ± 4,28	0,920
Masse du gastrocnémien (%)	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,372

7.4.2. Glycémie et réponse aux tests de tolérance à l'amidon et à l'insuline

Après 10 semaines d'entraînement, la glycémie à jeun était significativement plus basse dans le groupe HIIT ($18,0 \pm 3,0 \text{ mmol.l}^{-1}$) comparé au groupe MICT ($26,0 \pm 1,5 \text{ mmol.l}^{-1}$, $p < 0,05$) et au groupe CON ($30,0 \pm 1,5 \text{ mmol.l}^{-1}$, $p < 0,01$) (cf. Figure 16a). De même, les niveaux d'HbA_{1c} étaient significativement réduits dans le groupe HIIT ($6,0 \pm 0,4 \%$) en comparaison au groupe CON ($7,5 \pm 0,3 \%$, $p < 0,05$) (Figure 16b). L'insuline à jeun n'était pas différente entre les groupes (Figure 16c). L'ANOVA à mesures répétées réalisée sur les tests de tolérance à l'insuline (Figure 16d) et à l'amidon (Figure 16e) révèle des différences significatives entre les groupes à plusieurs temps de mesure. Toutefois, étant donné que l'AUC net (*i.e.* l'aire sous la courbe exprimée après soustraction du niveau de base de glycémie) ne diffère pas entre les groupes (données non présentées), nous concluons ici que les différences notées reflètent simplement les différences basales de glycémie.



7.4.3. Métabolisme oxydatif musculosquelettique

Dans le muscle gastrocnémien, l'analyse par western-blot de l'abondance des protéines OXPHOS a révélé une augmentation modeste mais significative de la quantité totale de protéines des complexes de la chaîne respiratoire pour le groupe HIIT vs. MICT et CON (p<0,0001, Figure 17b). L'AMPK est connu comme étant un important activateur des adaptations mitochondriales induites par l'entraînement, notamment via la régulation de PGC1- α (Marcinko, K. et Steinberg, G. R. 2014). Ici, nos résultats montrent que le rapport p-AMPK Thr172/AMPK n'a pas été affecté par l'exercice (Figure 17c). En accord avec cela, aucun effet de l'entraînement n'a été noté sur les niveaux d'ARNm de PGC1- α ou d'autres régulateurs connus de la biogénèse mitochondriale (Tfam, PPAR- α , PPAR- γ , NRF-1. Figure 17e). De même, les niveaux d'abondance de mitofusine-2 (MFN2), un marqueur de fusion mitochondriale qui est connu pour être réprimé dans un contexte de diabète et augmenté suite à l'exercice (Zorzano, A. 2009), n'étaient pas modifié par nos protocoles MICT ou HIIT (Figure 17d). En accord avec ces résultats concernant l'expression de gènes associés à la biogénèse mitochondriale,

nous n'avons pas mis en évidence de modification de l'activité de la CS et de la β -HAD suite aux 10 semaines d'entraînement (Figure 18c et d).

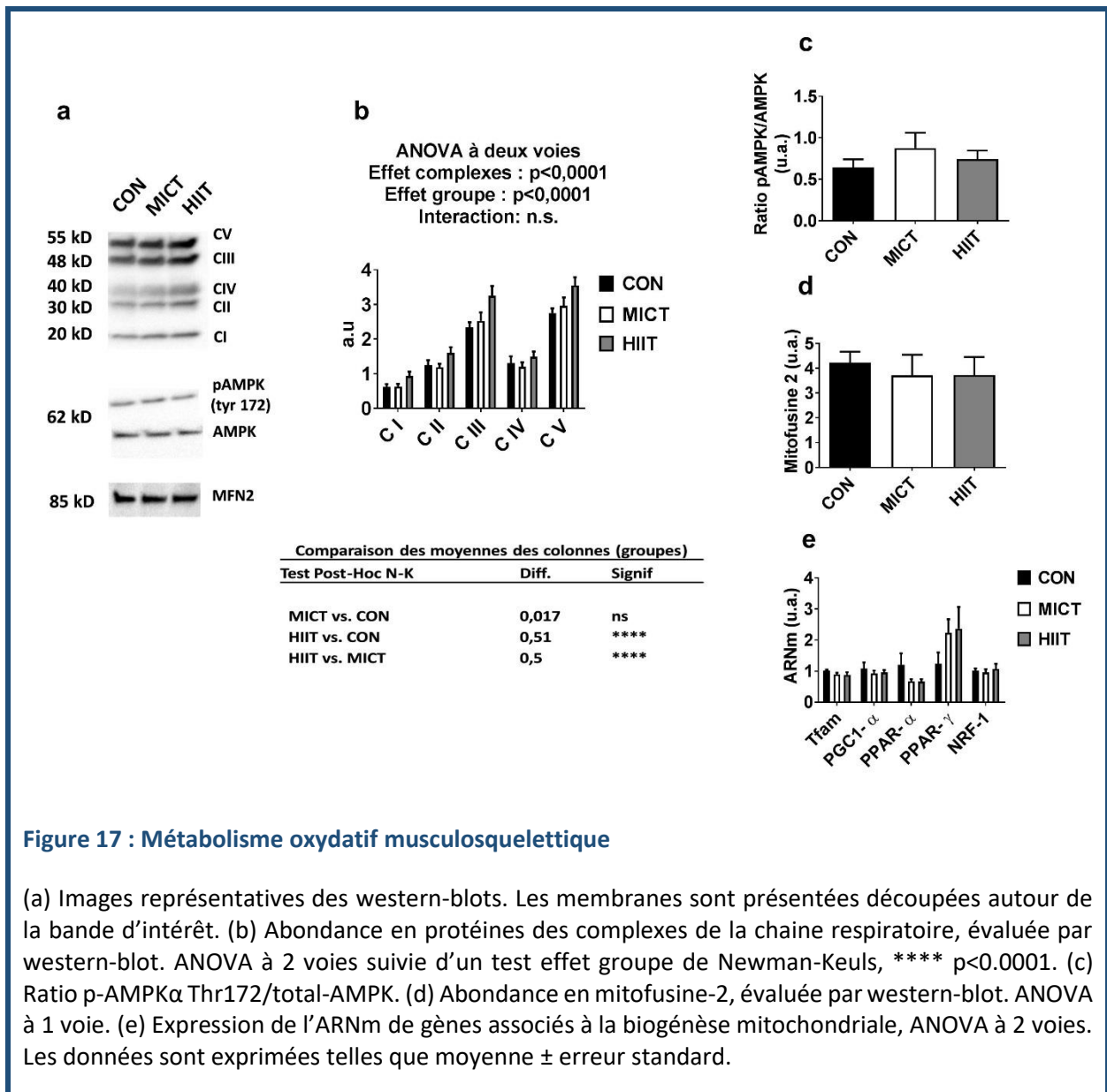


Figure 17 : Métabolisme oxydatif musculosquelettique

(a) Images représentatives des western-blots. Les membranes sont présentées découpées autour de la bande d'intérêt. (b) Abondance en protéines des complexes de la chaîne respiratoire, évaluée par western-blot. ANOVA à 2 voies suivie d'un test effet groupe de Newman-Keuls, **** $p < 0.0001$. (c) Ratio p-AMPK α Thr172/total-AMPK. (d) Abondance en mitofusine-2, évaluée par western-blot. ANOVA à 1 voie. (e) Expression de l'ARNm de gènes associés à la biogénèse mitochondriale, ANOVA à 2 voies. Les données sont exprimées telles que moyenne \pm erreur standard.

Nous avons également mesuré la consommation d' O_2 en absence d'ADP (appelé *leak state* ou V_0) et la respiration maximale (V_{max}) sur du gastrocnémien perméabilisé. Aucune différence n'a été mise en évidence entre les groupes concernant le flux d' O_2 stable après l'ajout séquentiel de palmitoyl-carnitine (V_0 PalC-M), d'ADP (V_{max} PalC-M), de pyruvate (V_{max} PalC-PM), de succinate (V_{max} PalC-PMS) et de CCCP (ETS) (Figure 18b).

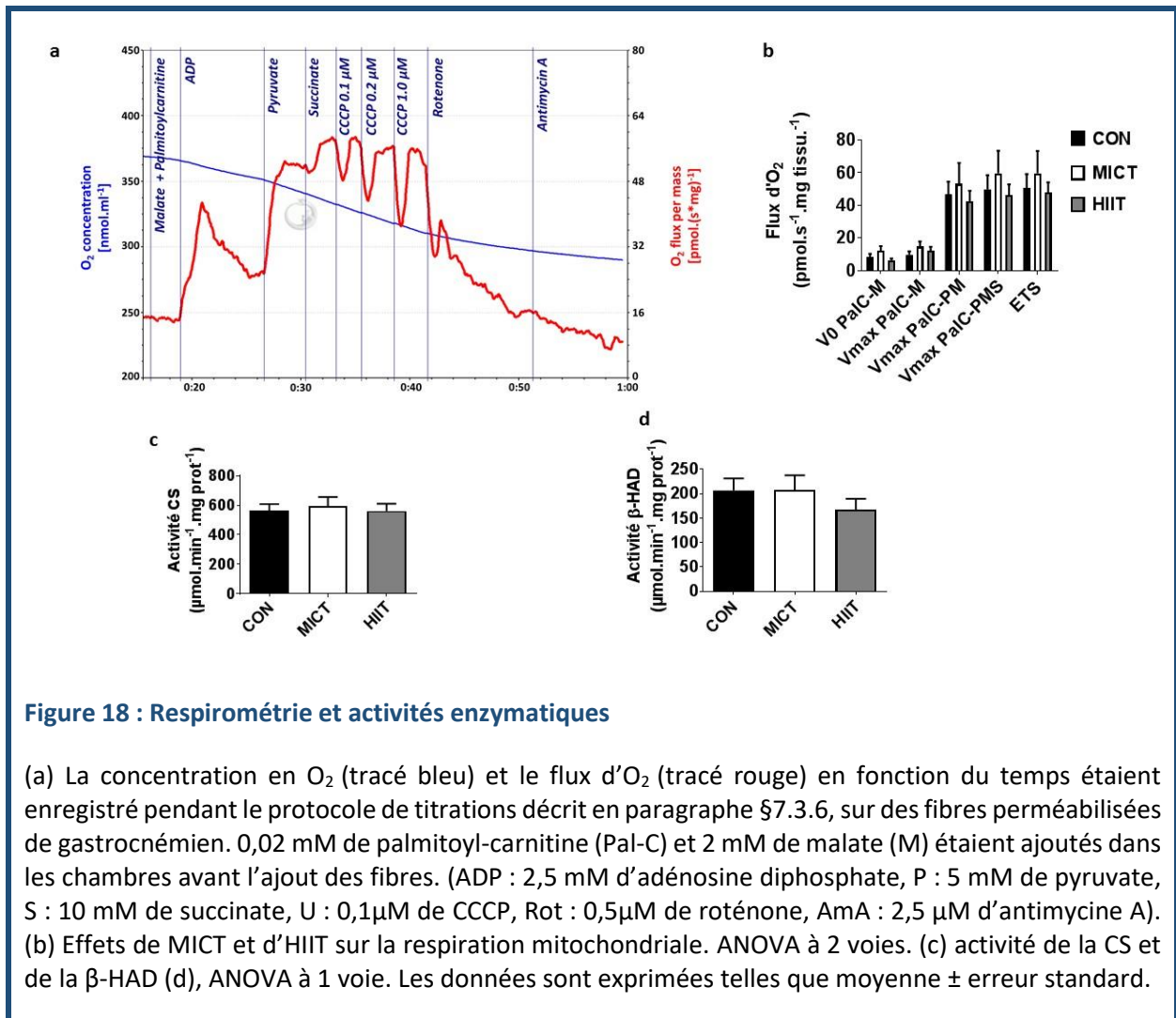


Figure 18 : Respirimétrie et activités enzymatiques

(a) La concentration en O₂ (tracé bleu) et le flux d'O₂ (tracé rouge) en fonction du temps étaient enregistré pendant le protocole de titrations décrit en paragraphe §7.3.6, sur des fibres perméabilisées de gastrocnémien. 0,02 mM de palmitoyl-carnitine (Pal-C) et 2 mM de malate (M) étaient ajoutés dans les chambres avant l'ajout des fibres. (ADP : 2,5 mM d'adénosine diphosphate, P : 5 mM de pyruvate, S : 10 mM de succinate, U : 0,1μM de CCCP, Rot : 0,5μM de roténone, AmA : 2,5 μM d'antimycine A). (b) Effets de MICT et d'HIIT sur la respiration mitochondriale. ANOVA à 2 voies. (c) activité de la CS et de la β-HAD (d), ANOVA à 1 voie. Les données sont exprimées telles que moyenne ± erreur standard.

7.4.4. Voie de signalisation de l'insuline et contenu en Glut4 dans le muscle squelettique

La phosphorylation d'Akt sur ses résidus phosphorylés Ser473 et thr308 était mesurée sur les muscles soléaires appariés incubés en présence ou absence de 12 nM d'insuline. L'ANOVA a montré un effet significatif de l'exercice (p<0,05) et une interaction significative exercice*insuline (p<0,05). L'analyse post-hoc a révélé un état de phosphorylation supérieur dans le groupe HIIT en comparaison au groupe MICT et CON (p<0,05) (Figure 19b). Le contenu en Glut4 était significativement plus élevé dans le groupe HIIT en comparaison au groupe CON dans le gastrocnémien (environ 2,5 fois, p<0,01) et le soléaire (environ 2 fois, p<0,05) (Figure 19c et d). Le contenu en Glut4 du soléaire était également significativement augmenté dans le groupe HIIT en comparaison au groupe MICT (Figure 19d, p<0,05).

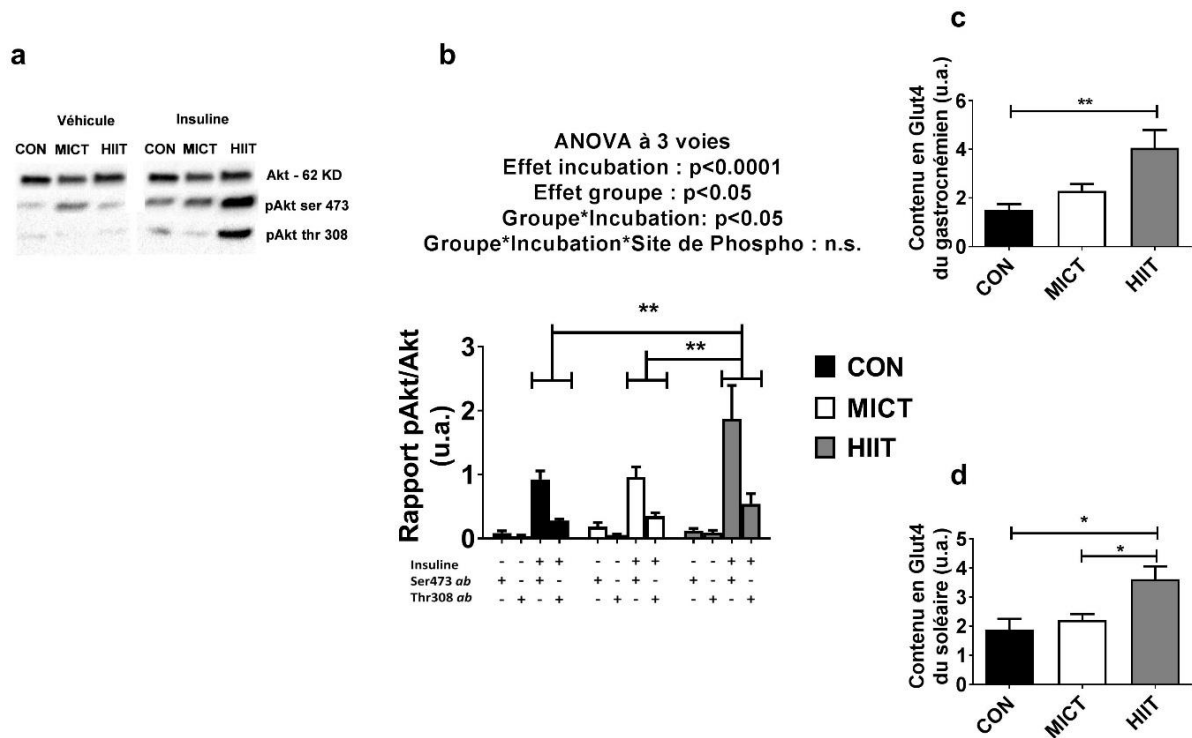


Figure 19 : Voie de signalisation de l'insuline et GLUT4

(a) Images représentatives des western-blots. Les membranes sont présentées découpées autour de la bande d'intérêt. (b) Rapports Akt_{Ser473}/Akt_{total} et Akt_{Thr308}/Akt_{total} en conditions basale et stimulée par l'insuline dans le muscle soléaire. ANOVA à 3 voies suivie d'un test post hoc effet groupe de Newman-Keuls, $**p < 0,01$. Détail complet des statistiques disponible en paragraphe §11.1 : Statistiques complètes étude 2a Figure 19. (c) Contenu en GLUT4 estimé par western Blot dans le muscle gastrocnémien et (d) soléaire. ANOVA à 1 voie suivie d'un test post-hoc de Tukey, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$. Les données sont exprimées telles que moyenne \pm erreur standard.

7.5. DISCUSSION

Les résultats de cette étude tendent à confirmer l'hypothèse selon laquelle l'entraînement de type HIIT améliore le métabolisme du glucose d'une manière supérieure au MICT. Nous n'avons pas observé de changements majeurs dans la fonction mitochondriale des groupes entraînés, ce qui suggère que les adaptations mitochondriales ne sont pas impliquées dans l'effet observé. Dans le muscle squelettique, la voie de signalisation de l'insuline et le contenu en Glut4 étaient améliorés uniquement dans le groupe HIIT, ce qui suggère que la sensibilité à l'insuline serait plus facilement modulable par le HIIT comparé au MICT. Ceci pourrait en partie expliquer l'amélioration de l'homéostasie glucidique suite au programme HIIT.

Nous avons choisi dans ce travail de comparer les effets de deux modalités d'entraînement chez la souris db/db. Ces animaux affichent rapidement une importante obésité entraînant le développement d'un DT2 en raison d'une mutation sur le gène codant pour le récepteur à la leptine (Boquist, L. *et al.* 1974). Le fait est qu'il n'y a pas de modèle parfait pour étudier le DT2. La pathologie est très complexe de par la multiplicité de ses déterminants génétiques et environnementaux (Jin, W. et Patti, M. E. 2009). Ainsi, bien que ce modèle monogénique du diabète ne soit naturellement pas représentatif de l'ensemble des formes de la maladie, celui-ci reste parmi les modèles les plus souvent utilisés et largement acceptés pour la recherche expérimentale sur le traitement du diabète (Leiter, E. H. 2009). La résistance à la leptine est une caractéristique courante du DT2 lié à l'obésité (Ceddia, R. B. *et al.* 2002), les souris db/db représentent ainsi un modèle intéressant qui partage la plupart des anomalies métaboliques observées chez le sujet humain (Leiter, E. H. 2009). Par ailleurs, il a déjà été démontré que les adaptations mitochondriales consécutives à l'exercice peuvent se retrouver inhibées en absence de leptine (Li, L. *et al.* 2011). Dans ce contexte, on peut émettre l'hypothèse que les adaptations mitochondriales à l'exercice dans le muscle squelettique sont peut-être difficiles à mettre en évidence chez la souris db/db. De manière similaire, il a été montré que les patients diabétiques qualifiés de « résistants à l'exercice » (ceux qui n'améliorent pas leur HbA_{1c} en réponse à un programme d'entraînement) affichent une incapacité concomitante à stimuler la biogénèse mitochondriale (Stephens, N. A. et Sparks, L. M. 2015; Stephens, N. A. *et al.* 2015). Ainsi, la souris db/db se positionne comme un bon candidat pour l'étude des effets de l'entraînement dans un contexte difficile, représentatif des patients diabétiques résistants à l'exercice. Toutefois, la réalisation de ce protocole sur un modèle du DT2 ne présentant pas cette particularité génétique pourrait s'avérer intéressant pour confirmer ou non nos résultats.

Nous avons observé une glycémie à jeun plus basse, confirmée par un taux d'HbA_{1c} diminué dans le groupe HIIT, malgré l'absence d'effets sur la composition corporelle, alors qu'aucune amélioration n'était observée dans le groupe MICT. A notre connaissance, cette étude était la première à comparer les effets d'HIIT et de MICT sur la fonction mitochondriale musculosquelettique dans un contexte de DT2. La revue des différents travaux déjà publiés témoigne de la difficulté à obtenir des changements bénéfiques induits par l'activité physique chez la souris db/db. Deux équipes de recherche ont testé HIIT sur ce modèle, en utilisant un protocole similaire. Ostler *et al.* ont observé des améliorations modestes sur la tolérance au glucose et la phosphorylation basale d'Akt sur son résidu sérine 473 (Ostler, J. E. *et al.* 2014). Stølen *et al.* ont noté une amélioration du profil lipidique (Stølen, T. O. *et al.* 2009). Cependant, aucune de ces équipes n'a observé de baisse de la glycémie à jeun. Parmi les auteurs ayant testé l'entraînement MICT sur la souris db/db, Lee *et al.* ont noté une amélioration de la tolérance à l'insuline (Lee, S. *et al.* 2011; Lee, S. *et al.* 2011) sans changements sur la glycémie à jeun, en utilisant un protocole d'entraînement continu proche du nôtre. D'autres études sur ce modèle ont abouti à une absence d'amélioration du contrôle glycémique, avec ce type de protocole (Sennott, J. *et al.* 2008; Broderick, T. L. *et al.* 2012; Trask, A. J. *et al.* 2012). Ainsi, notre travail confirme que les adaptations sur l'homéostasie glucidique consécutives à l'exercice sont difficiles à obtenir chez la souris db/db, renforçant l'idée que ces animaux se placent comme un potentiel modèle de résistance à l'exercice, dans le cas particulier de ces adaptations. Malgré cela, nos résultats montrent des effets positifs d'HIIT sur l'homéostasie glucidique dans ce contexte, consolidant l'intérêt d'étudier les effets ce mode d'entraînement dans un contexte de DT2 et plaçant cette modalité d'exercice comme un bon candidat pour combattre l'état de résistance à l'exercice.

Peu de changements sont intervenus suite à 10 semaines d'HIIT, concernant les paramètres mitochondriaux du muscle squelettique. Nous avons observé uniquement une augmentation de la quantité totale de protéines OXPHOS sans incidence sur la capacité oxydative fonctionnelle estimée *ex vivo* via la respiration mitochondriale de fibres musculaires perméabilisées. De manière similaire, les activités CS et β -HAD et l'expression d'ARNm de gènes liés à la biogénèse mitochondriale n'étaient pas affectés par le HIIT ou le MICT. Chez la souris *wild-type*, l'exercice chronique est un activateur bien connu d'AMPK, qui à son tour déclenche une réponse biogénique mitochondriale par l'induction de PGC1- α (Li, L. *et al.* 2011), ce mécanisme a également été confirmé chez l'Homme (Lee-Young, R. S. *et al.* 2009). Ces nouvelles données montrent que ce modèle de souris mutantes du DT2 n'a pas répondu aux effets stimulateurs de l'exercice chronique sur aucun des paramètres mesurés, suggérant que certaines étapes de la voie de signalisation pourraient être défectueuses. Comme il a déjà été suggéré lors d'expériences sur des souris ob/ob, un signal intact de la voie de la leptine est peut-être nécessaire pour les adaptations induites par l'exercice via AMPK et PGC1- α dans le muscle (Li, L. *et al.* 2011; Ostler,

J. E. *et al.* 2014), ceci pourrait donc expliquer la quasi absence d'adaptations de la fonction mitochondriale suite à l'entraînement, dans notre étude. Ces résultats obtenus avec des souris db/db sont également cohérents avec certaines observations faites chez l'Homme. En effet il a aussi été démontré que l'augmentation de PGC1- α et Mfn2 liée à l'exercice chronique est parfois inhibée chez les jeunes sujets diabétiques de type 2 (Hernandez-Alvarez, M. I. *et al.* 2010). Il est également important de spécifier que tous les tests réalisés sur muscle squelettique dans l'étude qui nous occupe ont été réalisés sur des tissus récoltés 72h après la dernière session d'exercice, pour éviter le biais d'un potentiel effet aigu de l'exercice (Siu, P. M. *et al.* 2003). Ainsi, on ne peut pas écarter la possibilité qu'une élévation transitoire de l'activation d'AMPK et de PGC1- α se soit produite après chaque session d'entraînement. Un tel effet pourrait expliquer la légère augmentation de la quantité de protéines de la chaîne respiratoire dans le groupe HIIT. Cependant, le fait que les mesures de respiration mitochondriales ne montrent aucune amélioration dans les groupes entraînés tend plutôt à indiquer que les adaptations mitochondriales fonctionnelles consécutives à l'entraînement ont été mineures voire nulles. Ainsi, ces nouvelles données ne sauraient remettre en question l'implication des adaptations mitochondriales dans les effets bénéfiques observés sur le contrôle glycémique suite au HIIT.

Bien qu'il semble plausible que les adaptations mitochondriales soient mises en jeu dans une partie des effets bénéfiques de l'activité physique, dans un contexte de DT2 (Little, J. P. *et al.* 2011), cette nouvelle étude suggère que des mécanismes indépendants de la fonction mitochondriale pourraient être impliqués pour expliquer les améliorations du contrôle glycémique suite au HIIT. Nous avons mis en évidence une augmentation significative de la phosphorylation d'Akt sur ses résidus Ser473 et Thr308 dans le groupe HIIT, par rapport au groupe CON. De manière intéressante, la baisse de phosphorylation d'Akt sur l'un ou l'autre de ces sites est une des caractéristiques principales du défaut de signalisation de la voie de l'insuline chez les patients DT2 (Karlsson, H. K. R. *et al.* 2005; Morino, K. *et al.* 2005). Ainsi, l'amélioration de ce paramètre chez nos souris pourrait refléter une diminution de l'insulinorésistance et pourrait expliquer en partie les effets positifs dans le groupe HIIT sur la glycémie à jeun. De plus, le contenu en Glut4 dans le soléaire et le gastrocnémien était significativement plus élevé dans le groupe HIIT, par rapport au groupe CON. De manière intéressante, les Glut4 jouent un rôle important dans la régulation de l'homéostasie glucidique de l'organisme. Plusieurs études utilisant des souris Glut4-KO ont montré que l'absence de cette protéine pouvait conduire à une hyperglycémie (Zisman, A. *et al.* 2000) ou à une intolérance au glucose chez la souris (Kim, J. K. *et al.* 2001; Fam, B. C. *et al.* 2012). De la même manière, les études traitant de l'effet d'une session unique d'exercice sur des souris déficientes en Glut4 concluent toutes que Glut4 est le facteur majeur responsable de la captation du glucose lors de l'exercice (Zierath, J. R. *et al.* 1998; Ryder, J. W. *et al.* 1999; Howlett, K. F.

et al. 2013). Réciproquement, la surexpression de Glut4 chez la souris saine et diabétique (db/db) améliore à la fois la glycémie à jeun et nourrie, l'action de l'insuline et la disparition du glucose sanguin lors d'un test de tolérance au glucose (Gibbs, E. M. *et al.* 1995; Ren, J. M. *et al.* 1995; Leturque, A. *et al.* 1996; Brozinick, J. T. *et al.* 2001). Par ailleurs, durant un exercice aigu, les souris surexprimant Glut4 semblent préférentiellement utiliser les glucides plutôt que les lipides comme source d'énergie, sans qu'il n'y ait d'impact sur la dépense énergétique globale (Bao, S. et Garvey, W. T. 1997). Ce postulat est toutefois remis en question par une étude plus récente utilisant du 2-Deoxy-[3H]glucose, qui n'a montré aucune différence entre les souris *wild-type* et des souris transgéniques sur la captation du glucose par le muscle à l'exercice (Fueger, P. T. *et al.* 2004), suggérant qu'un contenu normal en Glut4 est suffisant pour l'augmentation de la captation du glucose à l'exercice. Dans une autre étude, Ikemoto et son équipe ont démontré que l'exercice chronique résultait en une expression protéique de Glut4 augmentée chez la souris *wild-type* et transgénique surexprimant Glut4. Les auteurs ont ainsi prouvé que l'amélioration du contrôle glycémique était cumulative et concomitante de l'augmentation du contenu en Glut4, que ce soit suite à une manipulation génétique, l'entraînement ou les deux en même temps (Ikemoto, S. *et al.* 1995). Ainsi, dans notre étude, l'augmentation du contenu en Glut4 musculaire induite par HIIT est vraisemblablement responsable, tout au moins en partie, de la meilleure capacité du muscle à capter le glucose sanguin.

Les mécanismes qui sous-tendent les bénéfices supérieurs du HIIT par rapport au MICT sur l'amélioration de la voie de signalisation de l'insuline et le contenu en Glut4 restent à élucider. Une étude récente chez la souris saine et chez la souris obèse a évalué l'impact de l'intensité de l'exercice sur les adaptations physiologiques à l'entraînement (Cunha, V. N. *et al.* 2015). Cette étude a montré qu'une intensité d'exercice plus élevée entraînait de plus grandes améliorations du contenu en Glut4 musculosquelettique et du contrôle glycémique chez les animaux obèses. De plus, certaines voies de signalisation semblent particulièrement sensibles à l'intensité de l'exercice. Par exemple, Egan *et al.* ont montré sur le muscle squelettique humain que la phosphorylation d'HDAC, un activateur bien connu de la transcription de Glut4 (McGee, S. L. et Hargreaves, M. 2011), était augmentée suite à une session d'exercice à 80% du pic de $\dot{V}O_2$ mais pas après une session à 40% du pic de $\dot{V}O_2$ (Egan, B. *et al.* 2010). De nouvelles études seront nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui mènent aux différences observables entre HIIT et MICT sur les adaptations du contenu en Glut4 et de la voie de signalisation de l'insuline, chez la souris db/db. Enfin, il est important de rappeler que l'exercice est un stimulus puissant du turnover de l'ATP. Dans cette étude, bien que les sessions d'exercice aient eu la même durée dans les groupes HIIT et MICT, nous n'avons pas pu, pour des raisons techniques, mesurer la dépense énergétique pendant l'entraînement. Nous ne pouvons donc pas exclure que le débit énergétique supérieur induisant un plus grand turnover de l'ATP dans le groupe

HIIT ne constitue pas un autre facteur important impliqué dans l'effet sur la glycémie à jeun, dans ce groupe.

En conclusion, nous montrons dans ce travail que le HIIT a permis une meilleure amélioration du contrôle glycémique que le MICT, chez la souris db/db. Cet effet n'est pas associé dans cette étude à des améliorations de la fonction mitochondriale musculosquelettique. Seul l'entraînement intermittent à haute intensité a permis d'améliorer la voie de signalisation de l'insuline et le contenu en Glut4 dans le muscle squelettique. Dans leur ensemble, ces nouvelles données viennent renforcer l'intérêt du HIIT dans la prise en charge des patients DT2. En de la meilleure adhésion des patients pour cette modalité d'entraînement, HIIT pourrait également entraîner des effets bénéfiques supérieurs sur le contrôle glycémique. De nouvelles études seront nécessaires pour confirmer ces effets et pour élucider les mécanismes à l'origine de telles adaptations.

8. ETUDE 2 :

**EFFET DE TOTUM-63 SUR LE DEVELOPPEMENT DU DT2 DE
JEUNES SOURIS DB/DB ET DE JEUNES SOURIS NOURRIES AVEC
UN REGIME RICHE EN GRAISSE**

8.1. INTRODUCTION GENERALE

La progression du DT2 est préoccupante : en 2015, 415 millions de personnes dans le monde étaient touchées tandis que 318 millions de plus présentaient un prédiabète, un stade défini comme à haut risque de développer la pathologie, mais encore réversible. Les recommandations hygiéno-diététiques (activité physique et alimentation) constituent la première ligne d'intervention dans le cadre de la lutte contre l'apparition du DT2. Dans ce contexte, les compléments nutritionnels à base de plantes offrent de nouvelles perspectives de prise en charge, non en remplacement mais en ajout des stratégies préventives hygiéno-diététiques classiques et toujours en amont de l'approche pharmacologique. En effet, certains végétaux mis en évidence par des travaux ethno-épidémiologiques ont scientifiquement prouvé leur efficacité dans le cadre des pathologies métaboliques (Graf, B. L. *et al.* 2010), faisant d'eux des outils à la disposition des thérapeutes, au sein des premières lignes de traitement que constituent les interventions hygiéno-diététiques. La société Valbiotis a développé Totum-63, un complément nutritionnel à base d'extraits de 5 plantes (composition décrite en paragraphe §4.4.1), avec l'objectif d'une obtention d'allégation propriétaire article 14.1a, selon le règlement CE n°1924/2006 (détail de cette ambition en paragraphe §4.4.1). La première étape de ce projet était de constituer une preuve de concept quant à l'utilisation potentielle de Totum-63 pour prévenir le développement du prédiabète en DT2, et de dégager des pistes mécanistiques pouvant être à l'origine des adaptations observées. Les travaux préliminaires ayant permis de mettre au point la combinaison de 5 extraits (Test des extraits un à un, deux à deux, *etc.* Tests de différentes doses, ...) ont été réalisées en amont de cette thèse et ne seront pas présentés ici, nous nous intéresserons seulement à l'effet de la combinaison aboutie.

L'application à l'être humain restant notre objectif final, nous avons choisi d'explorer les effets de la supplémentation avec Totum-63 sur plusieurs modèles du prédiabète, ce qui est recommandé par certains auteurs, afin de représenter la diversité de la pathologie que l'on rencontre également chez l'être humain (King, A. J. F. 2012). Ainsi, la technologie sera testée sur 2 modèles du prédiabète, la jeune souris db/db (qui constitue un modèle commun avec l'étude 1 de cette thèse, sur l'activité physique) et la souris nourrie avec un régime riche en graisse (souris HF). Un schéma (Figure 20) permet de visualiser l'agencement chronologique des différentes expérimentations de l'étude 2 de cette thèse et des travaux préliminaires déjà cités qui lui sont associés.

Le modèle de souris db/db présente l'avantage d'un développement rapide et radical de la pathologie, les souris passant d'un stade non-pathologique à une insuffisance pancréatique en quelques semaines, en passant par le développement de l'insulinorésistance caractéristique de la physiopathologie du

prédiabète. Le second modèle, la souris HF, présente une évolution plus lente et nécessite une durée d'exploration plus longue, ne permettant généralement pas d'atteindre le stade d'insulinodépendance. C'est un modèle de souris non-mutant, plus physiologique, et centré sur le développement de la résistance périphérique des tissus à l'insuline (King, A. J. F. 2012; Islam, M. S. et Venkatesan, V. 2016).

L'objectif de ces expérimentations était de confirmer les effets bénéfiques de Totum-63 sur ces 2 modèles à travers des critères communs (masse grasse, glycémie et insulïnémie à jeun), et d'explorer quelques hypothèses mécanistiques qui pourraient sous-tendre les effets observés.

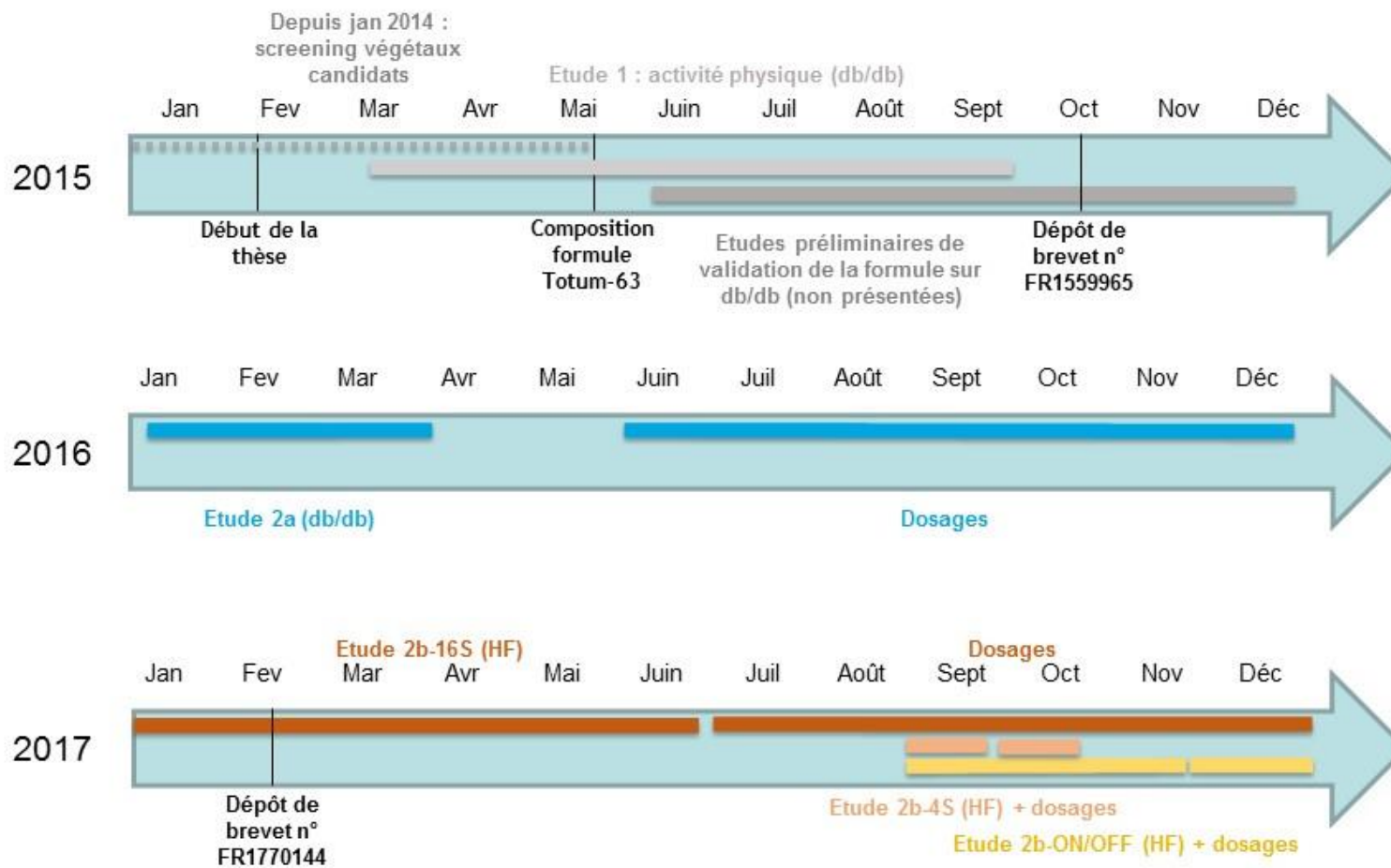


Figure 20 : Schéma chronologique des expérimentations de l'étude 2

8.2. ETUDE 2A : SOURIS DB/DB

8.2.1. Contexte

Les données présentées dans ce travail constituent une première tentative d'exploration mécanistique issue d'une série d'expérimentations sur le modèle de jeunes souris db/db (6 semaines). Ce modèle nous paraît parfaitement adapté pour le développement d'un produit ciblant le prédiabète, ainsi que cela avait été développé en paragraphe §6.1.1 et §6.1.2. Pour rappel, à cet âge, ces jeunes souris se situent dans une période de début de développement des symptômes du DT2, lequel se développe très rapidement en quelques semaines. Les jeunes souris db/db représentent ainsi pour nous un bon modèle préclinique du prédiabète, permettant d'obtenir des résultats rapidement, ce qui était un atout dans certaines étapes du développement du produit (choix des ingrédients, doses, ...).

Comme expliqué plus haut, de nombreuses expériences ont été nécessaires afin de mettre au point la combinaison finale Totum-63, et l'efficacité de celle-ci sur la glycémie à jeun des souris a ainsi déjà été prouvée au cours d'expérimentations précédentes, sur le même modèle. Par conséquent, une grande partie des données obtenues, notamment sur les paramètres de base constituant les critères d'évaluation d'efficacité primaires (masse, glycémie, prise alimentaire, ...), sont redondantes. Dans un souci de cohérence, nous ne présenterons ici que les résultats d'une seule expérimentation, mais une référence aux résultats obtenus précédemment pourra être faite lorsque celle-ci sera nécessaire pour la discussion.

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'effet d'une complémentation avec Totum-63 pendant 6 semaines sur le développement du diabète de jeunes souris db/db, et de mettre à jour une partie des mécanismes potentiellement impliqués dans les améliorations constatées. Spécifiquement, il s'agissait de mesurer l'effet d'une complémentation avec Totum-63 sur la prise de masse et la sensibilité à l'insuline systémique et tissulaire de 2 organes impliqués dans la physiopathologie : le muscle et le foie.

8.2.2. Méthode

8.2.2.1. Animaux

40 souris db/db mâles âgées de 5 semaines ont été utilisées pour cette étude, les caractéristiques des animaux, de leurs conditions d'hébergement et de leurs régimes sont décrites en paragraphe §6.1. Après une semaine d'acclimatation, les animaux étaient répartis dans les groupes contrôle (CON, régime standard tel que décrit en paragraphe §6.1.3 : *Régimes*, n=20) ou T63 (régime standard

supplémenté avec 2,7% de Totum-63, n=20). Les souris étaient nourries *ad libitum* pendant 6 semaines, avant d'être mises à jeun pendant 6h puis mises à mort par décapitation. Dix minutes avant la mise à mort, les animaux recevaient une injection intrapéritonéale d'insuline (4,6 U/kg de masse maigre) ou un volume similaire de véhicule (NaCl 0,9%). Les tissus étaient alors prélevés (gastrocnémien, foie) et congelés dans de l'azote liquide immédiatement après dissection.

8.2.2.2. Procédures in vivo

Masse et prise alimentaire

La masse et la prise alimentaire des animaux étaient mesurées chaque semaine.

Composition corporelle

La masse maigre et la masse grasse étaient évalués en début (Semaine 0) et fin (Semaine 6) de protocole, selon la méthode décrite en paragraphe §6.2.1.

Glycémie et insulïnémie

La glycémie et l'insulïnémie étaient mesurées chaque semaine, après une mise à jeun de 6h, selon les méthodes décrites respectivement en paragraphe §6.2.4 et paragraphe §6.4.4.2.

Test oral de tolérance au glucose (OGTT)

L'OGTT était réalisée en fin de protocole selon la méthode décrite en paragraphe §6.2.6 : *Test oral de tolérance aux glucides (OGTT)*. La glycémie était monitorée pendant les 2 heures suivant un gavage oral d'une solution de glucose (4,6 g/kg de masse maigre) sur les souris préalablement mises à jeun depuis 6 heures. La glycémie était mesurée avant intervention (0), puis 15, 30, 60, 90 et 120 minutes après, grâce à un prélèvement de sang total réalisé au bout de la queue de l'animal. L'insulïnémie était mesurée avant (0) puis 15 et 60 minutes après le gavage, grâce à un prélèvement de sang total réalisé au bout de la queue de l'animal. Le sang total était récupéré dans un tube Microvette® (Starstedt, Allemagne) traité à l'EDTA puis centrifugé à 2000g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant (plasma) était récupéré et congelé à -80°C jusqu'à analyse, selon le protocole décrit en paragraphe §6.4.4.2.

8.2.2.3. Collecte de sang et paramètres plasmatiques

Après décapitation, le sang total était recueilli immédiatement après la mise à mort de la souris et une petite portion destinée au dosage d'HbA_{1c} (20µL) était collectée dans un tube traité avec 1µL d'EDTA (0,1), puis laissée dans de la glace jusqu'à analyse. Le reste du sang était collecté dans un tube Microvette® (Starstedt, Allemagne) traité à l'EDTA puis centrifugé à 2000g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant (plasma) était récupéré et congelé à -80°C jusqu'à analyse.

Les triglycérides plasmatiques et le taux d'HbA_{1c} étaient mesurés selon les méthodes décrites respectivement en paragraphe §6.4.4.4 et paragraphe §6.4.4.9.

8.2.2.4. Triglycérides hépatiques

Le contenu en triglycérides hépatiques était évalué à partir de morceaux de foie congelés, selon la méthode décrite en paragraphe §6.4.4.5.

8.2.2.5. Western-Blot

Les protéines des muscles gastrocnémien et du foie étaient extraites selon le protocole décrit en paragraphe §6.4.1.1.

Pour le western blot, 15 µg de protéines étaient déposées. Le protocole et les spécificités des anticorps sont décrits dans le Tableau 6, en paragraphe §6.4.1.2.

8.2.2.6. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± erreur standard à la moyenne. Le détail du choix des tests statistiques est explicité en paragraphe §6.5: Statistiques.

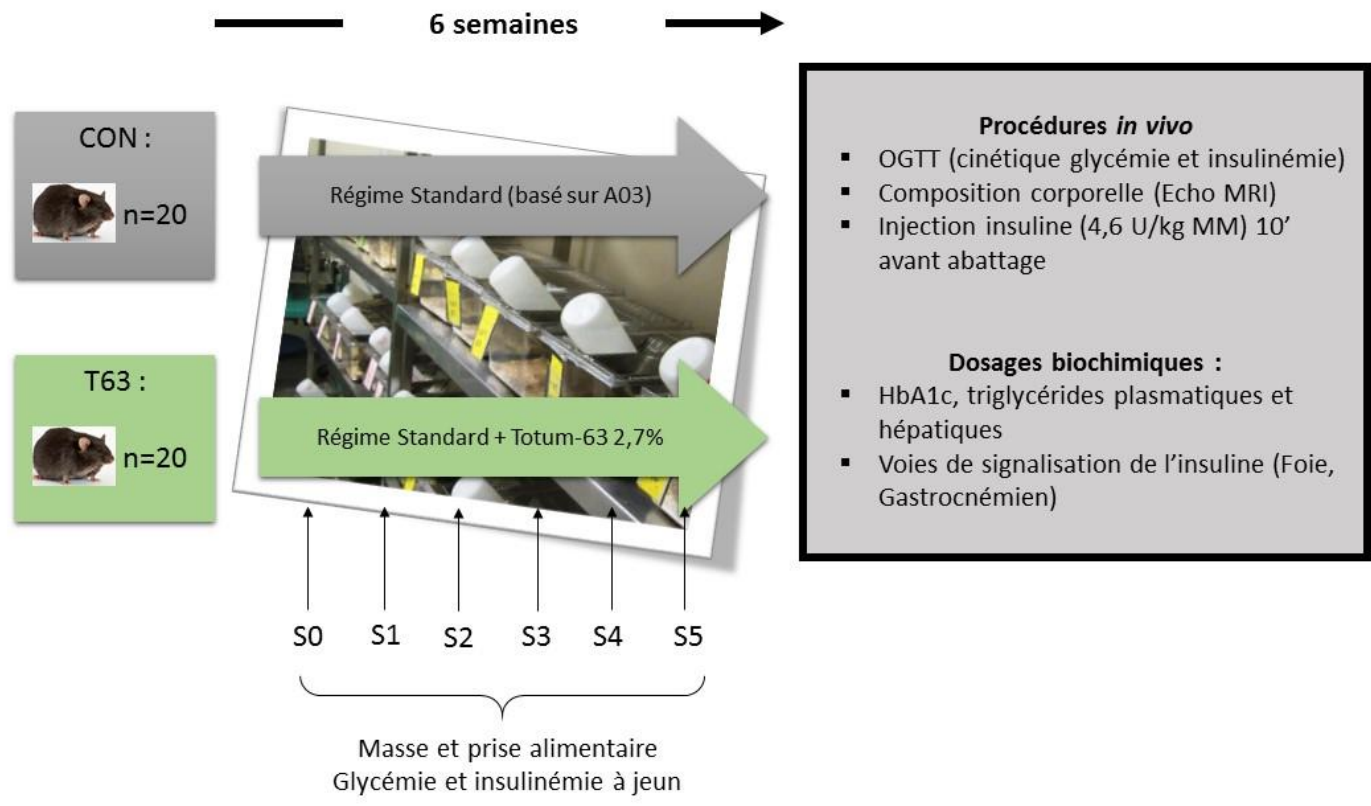


Figure 21 : Design de l'étude 2a

8.2.3. Résultats

8.2.3.1. Prise énergétique

Contrairement aux données issues des expérimentations préalables réalisées sur le même modèle (cf. paragraphe §8.2.1 : Contexte), Totum-63 a significativement diminué la prise alimentaire des souris ($24,60 \pm 0,4453$ kcal/j vs. $21,71 \pm 1,124$ kcal/j en moyenne, $p < 0,05$, Figure 22 A et B). La variabilité de la prise énergétique était très importante dans le groupe T63. Afin de vérifier l'effet de T63 dans un contexte isoénergétique, les souris du groupe T63 ont été divisées en 2 sous-groupes : T63+ (souris ayant consommé en moyenne plus de 20 kcal/j, $n=10$) et T63- (souris ayant consommé en moyenne moins de 20 kcal/j, $n=8$), de sorte qu'aucune différence significative n'existait entre CON et T63+ ($24,60 \pm 0,4453$ kcal/j vs. $25,04 \pm 1,069$ kcal/j, respectivement). La prise énergétique moyenne dans le groupe T63- était inférieure à CON et à T63+ d'environ 30% ($17,55 \pm 0,7609$ kcal/j, $p < 0,0001$; Figure 22 C et D).

8.2.3.2. Composition corporelle

Les animaux des groupes T63+ et T63- affichent une masse significativement inférieure au groupe CON, dès la 2^e semaine de supplémentation (respectivement $30,89 \pm 0,68$ g et $29,39 \pm 0,73$ g vs. $35,10 \pm 0,82$ g ; $p < 0,05$ et $p < 0,01$, respectivement Figure 22 E). Aucune différence significative n'a été mise en évidence pendant toute la durée de supplémentation entre les masses des souris des groupes T63+ et T63-. Après 6 semaines de supplémentation, les souris des groupes T63+ et T63- affichent un gain de masse significativement inférieur aux souris du groupe CON (respectivement $7,91 \pm 0,99$ g et $6,363 \pm 1,12$ g vs. $12,89 \pm 1,29$ g, $p < 0,01$; Figure 22 F). Là encore, aucune différence significative n'existe entre les groupes T63+ et T63-, suggérant un effet de T63 sur la prise de masse des souris indépendant de la prise alimentaire.

Cet effet est principalement expliqué par une moindre prise de masse grasse dans les groupes T63+ et T63- en comparaison au groupe CON (respectivement, après 6 semaines : $18,40 \pm 0,68$ g et $16,86 \pm 0,93$ g vs. $22,80 \pm 1,03$ g, $p < 0,01$; Figure 22 G). La masse grasse n'étant affectée significativement que dans le groupe T63- ($14,73 \pm 0,44$ g), en comparaison aux groupes T63+ ($16,31 \pm 0,37$ g, $p < 0,05$) et CON ($16,66 \pm 0,32$ g, $p < 0,01$) (Figure 22 H).

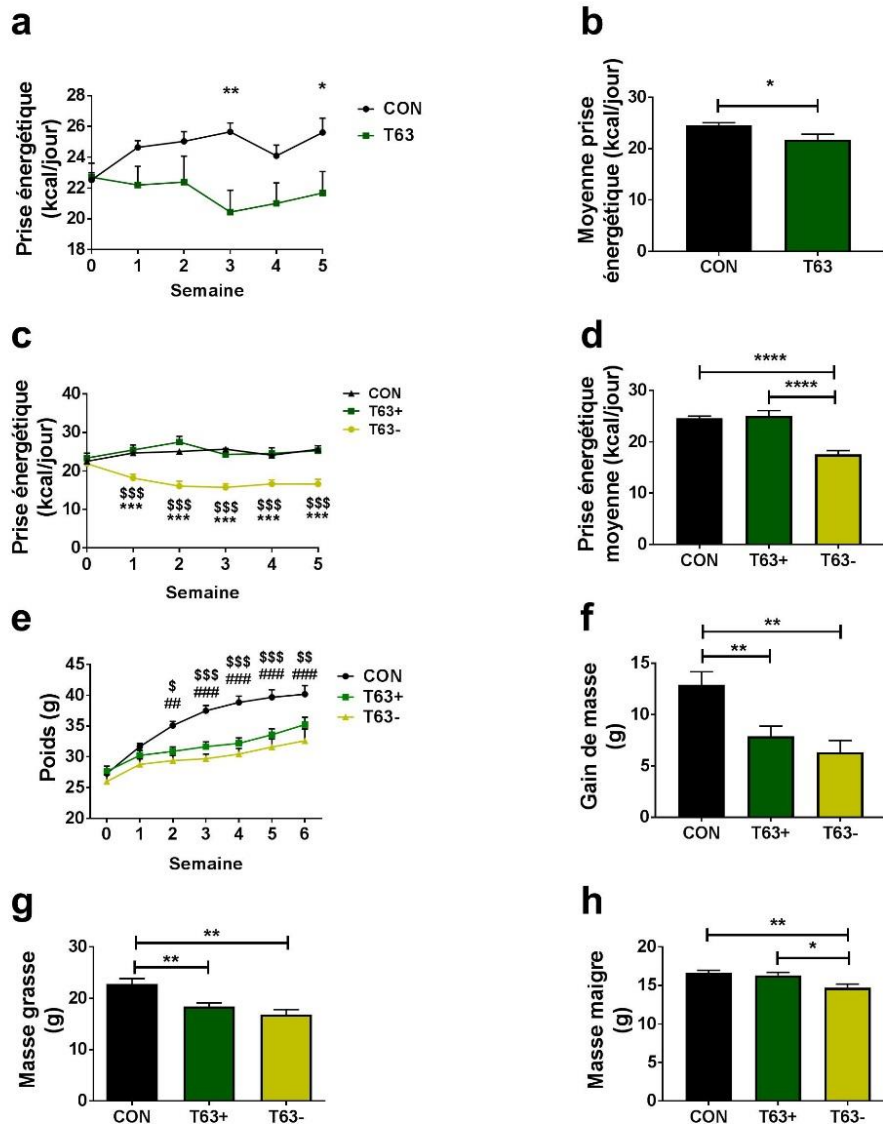


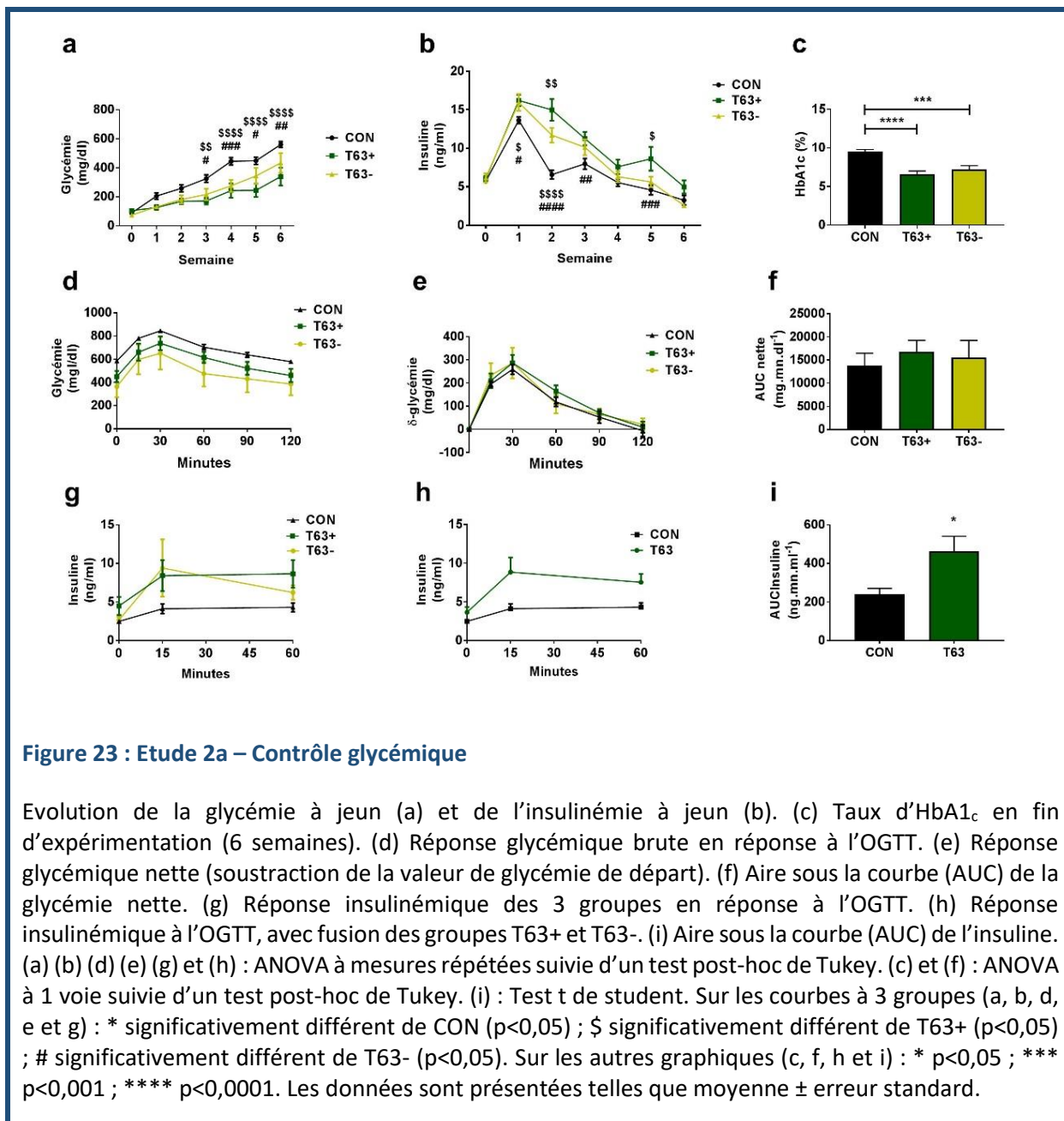
Figure 22 : Etude 2a - Prise alimentaire et composition corporelle

Evolution de la prise alimentaire (a) et prise alimentaire moyenne sur les 6 semaines d'expérimentation (b), groupes CON et T63 entier. Evolution de la prise alimentaire (c) et prise alimentaire moyenne sur 6 semaines (d) après séparation du groupe T63 en 2 : T63+ et T63-. (e) Evolution du poids des animaux. (f) Gain de masse total des animaux après 6 semaines. Masse grasse (g) et masse maigre (h), après 6 semaines. (a) (c) et (e) : ANOVA à mesures répétées suivie d'un test post-hoc de Tukey. (b) Test t de student. (d) (f) (g) et (h) : ANOVA à 1 voie suivie d'un test post-hoc de Tukey. Sur les courbes à 3 groupes (c et e) : * significativement différent de CON ($p < 0,05$) ; \$ significativement différent de T63+ ($p < 0,05$) ; # significativement différent de T63- ($p < 0,05$). Sur les autres graphiques (a, b, d, f, g, h) : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Les données sont présentées telles que moyenne \pm erreur standard.

8.2.3.3. Glycémie, insulïnémie et HbA_{1c}

La glycémie à jeun des souris des groupes T63+ et T63- était significativement plus basse que celle des souris du groupe CON, dès 3 semaines de supplémentation (respectivement $171,00 \pm 23,68$ mg/dl et $215,63 \pm 39,74$ mg/dl vs. $324,70 \pm 27,16$ g, $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement ; Figure 23 A). Cette différence était maintenue pendant toute la durée restante d'expérimentation entre les groupes T63+ et T63- vs. CON, sans qu'aucune différence ne soit relevée, à aucun moment, entre les groupes T63+ et T63- (Figure 23 A). De manière similaire, le pourcentage d'hémoglobine glyquée était significativement diminué dans les groupes T63+ et T63- en comparaison au groupe CON (respectivement $6,60 \pm 0,39$ % et $7,22 \pm 0,48$ % vs. $9,53 \pm 0,25$ %, $p < 0,0001$ et $p < 0,001$; Figure 23 C). Aucune différence significative n'existait entre T63+ et T63-.

L'insulïnémie à jeun des souris des 3 groupes évoluait globalement à la baisse après une hausse à semaine 1. Il n'existait pas de différence significative entre les groupes à la fin des 6 semaines d'expérimentation (Figure 23 B).



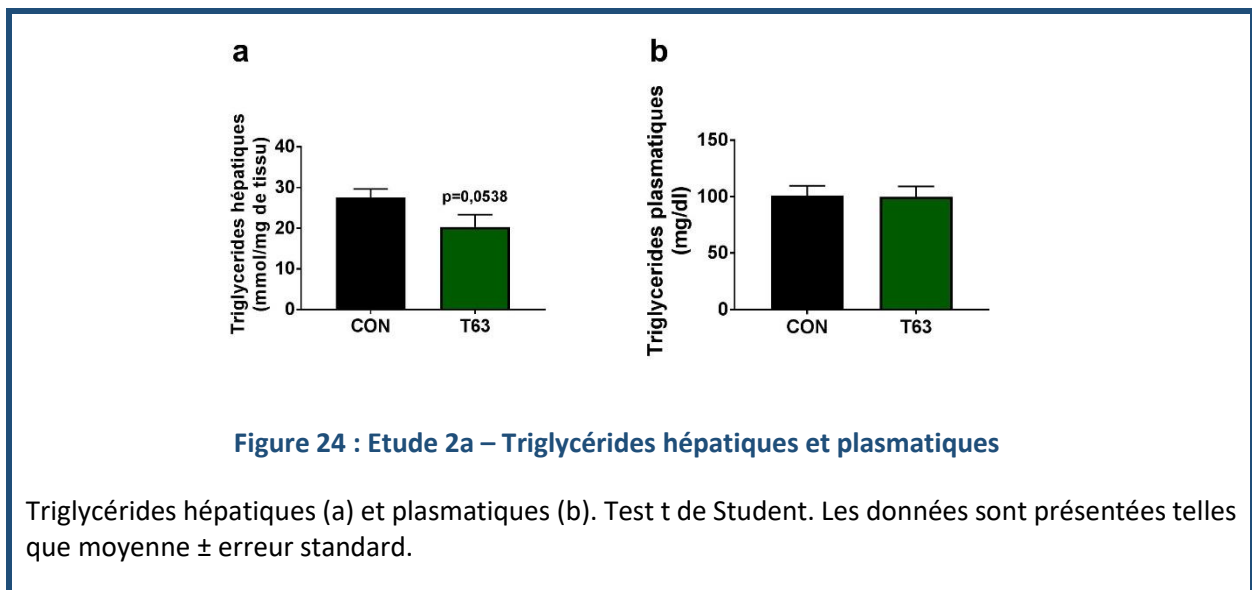
8.2.3.4. Réponses à l'OGTT

Suite à un gavage oral en glucose, aucune différence significative n'était relevée entre les 3 groupes en ce qui concerne l'évolution de la glycémie (valeurs brutes, Figure 23 D, ou nettes, Figure 23 E) ou son aire sous la courbe brute (données non présentées) ou nette (Figure 23 F). L'évolution de l'insulinémie semble tendre vers une hausse de la sécrétion d'insuline, en réponse au gavage oral en glucose, dans les groupes T63+ et T63-, sans toutefois atteindre le seuil de significativité (ANOVA 2 voies à mesures répétées, interaction : $p = 0,075$; Figure 23 G). En regroupant les deux groupes T63+ et T63- ensemble (groupe T63), une différence significative est mise en évidence sur l'aire sous la courbe de l'insuline, avec une quantité supérieure d'insuline produite dans le groupe T63 en comparaison au

groupe CON, en réponse au gavage en glucose ($463 \pm 77,24$ ng.mn.ml⁻¹ vs. $239,80 \pm 77,24$ ng.mn.ml⁻¹, $p < 0,05$; Figure 23 H et I).

8.2.3.5. Triglycérides hépatiques et plasmatiques

La supplémentation avec Totum-63 tend à diminuer la quantité de triglycérides présents dans le foie, en comparaison au groupe CON ($20,33 \pm 3,01$ mmol/mg de tissu vs. $27,54 \pm 2,11$ mmol/mg de tissu, $p = 0,054$; Figure 24 A). Aucun effet n'a été mis en évidence sur les triglycérides plasmatiques.



8.2.3.6. Voie de signalisation de l'insuline dans le foie et le muscle squelettique

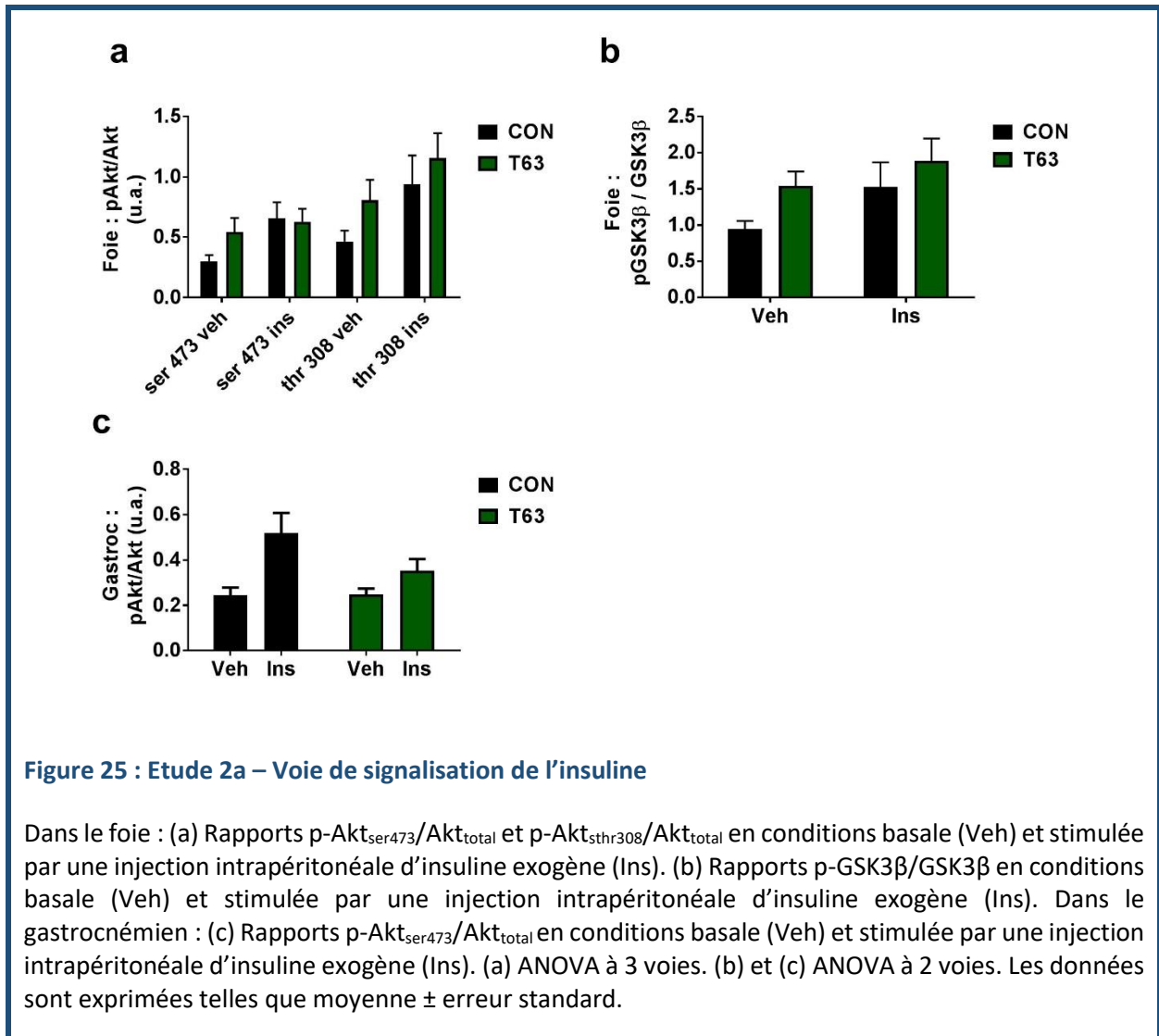
Dans le foie

L'injection intrapéritonéale d'insuline exogène 10 minutes avant l'abattage des animaux n'a pas permis de mettre en évidence une différence au niveau des rapports de phosphorylation $p\text{-Akt}/\text{Akt}_{\text{total}}$ stimulés par l'insuline, entre les deux groupes (sur les résidus phosphorylés étudiés : sérine 473 et thréonine 308 ; Figure 25 a).

De la même manière, le rapport de phosphorylation $p\text{-GSK3}\beta/\text{GSK3}\beta_{\text{total}}$ n'affichait pas de différence entre les groupes suite à une stimulation par l'insuline (Figure 25 b).

Dans le gastrocnémien :

Pas de différence n'a été mise en évidence au niveau du rapport de phosphorylation p-Akt/Akt_{total} (sur le résidu sérine 473), que ce soit en condition stimulée par l'insuline (Figure 25 e) ou basale (Veh, Figure 25 c).



8.2.4. Discussion

Nous avons observé lors de cette étude un effet sur la prise alimentaire (diminution) des souris du groupe T63, caractérisé par une importante variabilité (plus de la moitié des souris semblaient non-répondantes à cet effet et affichaient une prise énergétique non-différente de celle du groupe CON) et qui n'avait jamais été constaté lors des expériences précédentes. Il reste ainsi difficile de conclure quant aux raisons de l'apparition de cet effet et nous aurons soin de contrôler la prise alimentaire des animaux lors des expérimentations réalisées sur d'autres modèles (développées ci-après).

Afin de vérifier l'effet de T63 dans un contexte isoénergétique, les souris du groupe T63 ont été divisées en 2 sous-groupes : T63+ (isoénergétique : consommation non différente de CON, N=10) et T63- (consommation réduite d'environ 30% en moyenne, par rapport aux groupes CON et T63+). La complémentation avec Totum-63 a ainsi limité significativement la prise de masse des jeunes souris db/db en impactant fortement la prise de masse grasse, sans différence entre les sous-groupes T63+ et T63-, ce qui suggère un effet sur la prise de masse grasse indépendant de la prise énergétique. L'effet de T63 sur la prise de masse est apparu, dans cette expérimentation, dès la 2^e semaine de supplémentation, suggérant une action rapide de la combinaison. La masse maigre était seulement diminuée dans le groupe T63- (vs. CON et vs. T63+). L'absence d'impact significatif sur la masse grasse (notamment) d'une réduction de 30% de l'apport énergétique cumulé à la prise de Totum-63 (groupe T63-), en comparaison au groupe T63+ peut s'avérer surprenant, la restriction énergétique étant un moyen efficace et bien connu de limiter la prise de masse grasse sur ce modèle et chez l'homme. Une explication possible est que, dans le cas qui nous occupe, cet effet ait été compensé par l'absorption d'une dose plus importante de Totum-63 dans le groupe T63+⁶.

Parallèlement, la hausse de la glycémie et de l'HbA1c, caractéristiques du développement du DT2 chez ce modèle, étaient fortement limitées chez les deux sous-groupes T63+ et T63-, sans différence entre eux, ce qui renforce la thèse d'un effet de Totum-63 indépendant de la prise énergétique.

Ces données sont corroborées par celles obtenues lors d'expérimentations précédentes, et viennent renforcer les conclusions déjà établies quant à l'effet de Totum-63 sur la masse grasse et la glycémie à jeun, sur ce modèle.

L'OGTT n'a pas permis de mettre en évidence d'effet sur la réponse glycémique de Totum-63, mais l'aire sous la courbe de l'insulinémie était significativement supérieure dans le groupe T63. Contrairement au groupe CON, les souris du groupe T63 ont réagi à la charge en glucose par une stimulation de la production d'insuline, destinée à réguler le pic de glycémie. En comparaison, la courbe insulinémique du groupe CON ne présente qu'une augmentation faible voire quasi-nulle de l'insulinémie basale, en réponse à l'OGTT. Ce résultat a déjà été rencontré par d'autres équipes travaillant avec ce modèle de souris db/db. Par exemple, l'équipe de Du rapportait en 2012 une plus grande sécrétion d'insuline lors de la 1^{ère} phase de réponse à une charge intrapéritonéale de glucose sur des souris db/db de 12 semaines ayant suivi un traitement à la rhéine⁷ (Du, H. *et al.* 2012). La même année, et toujours sur ce modèle, l'équipe de Zhong retrouvait ce résultat en traitant les animaux avec une molécule destinée à inhiber l'absorption du cholestérol (Zhong, Y. *et al.* 2012). Dans ces 2 travaux,

⁶ Le mélange d'extraits de plantes Totum-63 est directement incorporé dans l'alimentation des animaux. La quantité de complément absorbée est donc directement proportionnelle à la quantité de nourriture ingérée.

⁷ La rhéine est un composé phytochimique issu de la rhubarbe.

les auteurs avaient mesuré une masse de cellules- β plus importante dans le groupe traité qui expliquait la capacité de sécrétion préservée. Ainsi, dans notre travail, l'aire sous la courbe de l'insuline (en réponse à l'OGTT) augmentée dans le groupe T63 traduit peut-être une capacité de production de celle-ci préservée dans les cellules- β du pancréas (Du, H. *et al.* 2012; Zhong, Y. *et al.* 2012). De manière intéressante, l'épuisement de la fonction sécrétoire de ces cellules est l'une des caractéristiques du développement de la physiopathologie du DT2. Elle figure parmi les dernières étapes de ce développement, et correspond à l'instauration définitive de l'insulinodépendance des patients et donc du diabète proprement dit (cf. paragraphe § 3.2.1 : Evolution du diabète de type 2 et paragraphe §4.1.4.1 : Caractérisation de la dysfonction des cellules β). La supplémentation avec Totum-63 a peut-être donc retardé l'apparition définitive du DT2 en préservant l'épuisement de la fonction pancréatique, chez ce modèle de souris db/db. Cela pourrait être expliqué par la glycémie plus basse dans le groupe T63, la glucotoxicité étant, on l'a vu, un facteur connu de dysfonction pancréatique (cf. 4.1.4.1 :Caractérisation de la dysfonction des cellules β). Une moindre accumulation de lipides (moindre lipotoxicité) et un effet anti-inflammatoire sont également des hypothèses privilégiées, qui feront l'objet d'une étude spécifique sur le pancréas.

Dans un souci de puissance statistique et en raison de l'absence de différence entre les sous-groupes T63+ et T63- sur les critères précédents qui laisse penser à une absence d'effet de la prise alimentaire sur les paramètres observés, les questions suivantes ont été adressées en gardant le groupe T63 entier.

Aucune différence n'était notée entre les groupes en ce qui concerne les triglycérides circulants, en revanche, dans le foie, nous avons observé une tendance à la diminution des triglycérides hépatiques chez T63. L'accumulation de triglycérides dans le foie est un élément déterminant de l'instauration d'une stéatose hépatique (Reddy, J. K. et Sambasiva Rao, M. 2006), qui expose notamment à un risque accru de développer une stéatohépatite. De manière intéressante, la présence d'une stéatose dans le foie représente une cause reconnue de l'instauration de la résistance à l'insuline dans ce tissu (Matsuzaka, T. et Shimano, H. 2011; Perry, R. J. *et al.* 2014). Le foie est l'un des organes insulino-sensibles parmi les plus impliqués dans les causes de l'hyperglycémie chronique, étant notamment le site principal de la production hépatique de glucose (cf. paragraphe §4.1.6), la tendance d'amélioration de la stéatose hépatique a pu être l'un des mécanismes contributeurs des améliorations observées sur l'hyperglycémie à jeun des souris du groupe T63. Cibler la stéatose hépatique pour améliorer la sensibilité à l'insuline est d'ailleurs déjà considéré comme une piste thérapeutique sérieuse par certains auteurs (Fruci, B. *et al.* 2013). Les mécanismes sous-tendant ces possibles améliorations restent à explorer. Plusieurs pistes sont envisagées, notamment une réduction du flux d'acides gras dans le cadre du dialogue tissu adipeux – foie, ou bien un impact de Totum-63 sur le stockage lipidique dû à la diminution de l'inflammation ou du stress oxydant : Des pistes plausibles

au vu de la composition de Totum-63. Des travaux récents ont en effet déjà montré le lien existant entre la diminution de l'inflammation hépatique et du stockage lipidique de l'organe, via notamment, l'activation des PPARs ou des récepteurs nucléaires des oxystérols (*Liver X receptors*), un facteur de transcription proche des PPARs (El Kamouni, S. *et al.* 2017).

L'injection aigue d'insuline exogène dans ce modèle n'a pas permis de mettre en évidence une activation supérieure de protéines de la voie de signalisation de l'insuline grâce à Totum-63, en comparaison au groupe CON, dans les deux organes explorés (foie et gastrocnémien). Ces mesures ne permettent donc pas d'expliquer la baisse de l'hyperglycémie dans le groupe T63. Il donc que d'autres organes soient impliqués dans cette adaptation, par exemple le tissu adipeux ou bien un muscle de phénotype lent (soléaire). Il est également possible, en raison du développement extrême de la pathologie dans ce modèle, que ces organes aient bénéficié d'une amélioration plus tôt dans le protocole.

En conclusion, nous montrons ici que la supplémentation avec Totum-63 a permis une diminution de la masse grasse et une baisse de l'hyperglycémie à jeun, chez la souris db/db. Un effet variable de Totum-63 sur la prise alimentaire des souris a également été observé. Cette potentielle action de la combinaison reste à éclaircir car elle n'existait pas lors des expérimentations préliminaires et qu'elle reste très variable d'un individu à l'autre dans ce travail, avec la présence d'individus répondants (n=8) et non-répondants (n=10) à cet effet. Les prochaines expérimentations devront s'attacher à élucider cette question. Egalement, Totum-63 pourrait avoir permis de préserver la capacité sécrétoire du pancréas, de diminuer la présence de triglycérides hépatiques. D'autres organes devront être mis à l'étude (tissu adipeux, muscle au phénotype lent) sur ce modèle. De nouveaux sur des modèles différents seront nécessaires pour confirmer ces effets et pour élucider les mécanismes physiologiques impliqués.

8.3. ETUDE 2B : SOURIS HF

8.3.1. Contexte

L'expérimentation décrite précédemment sur le modèle de jeunes souris diabétiques db/db constituait une preuve de concept d'efficacité de Totum-63 sur la réduction d'un facteur de risque de développement du DT2 : l'hyperglycémie. Également l'action de Totum-63 suggérait une préservation de la fonction sécrétoire des cellules bêta du pancréas, chez ce modèle au développement pathologique extrême. L'exploration des bénéfices de Totum-63 sur l'hyperglycémie était significative dès 2 semaines de supplémentation, suggérant également une action sur les stades précoces du développement pathologique du DT2. Ce nouveau travail propose donc une exploration du prédiabète, caractérisé par une résistance à l'insuline périphérique et une hyperinsulinémie compensatoire. Nous avons choisi d'évaluer l'effet de cette complémentation à base de plantes sur le développement du DT2 d'un modèle murin non-mutant : la souris C57BL6 nourrie avec un régime riche en graisse (souris HF). Les caractéristiques de ce modèle ont été détaillées en paragraphe §6.1.2. Brièvement, ces animaux développent une insulino-résistance due à un surplus énergétique entraînant une prise de masse grasse, ce qui en fait un bon modèle d'étude du prédiabète, fidèle au développement physiopathologique retrouvé chez l'être humain. La pathologie se développe et s'aggrave avec l'allongement de la durée de l'exposition au régime pathogène (Turner, N. *et al.* 2013). C'est donc un modèle complémentaire du modèle de souris diabétiques db/db. L'évolution est plus lente, ce qui laisse la possibilité d'observer des changements qui auraient pu être occultés par la rapidité du développement pathologique, chez le modèle diabétique db/db, notamment au niveau de la phase clef d'intervention thérapeutique qui suscite notre intérêt : le prédiabète, qui constitue, rappelons-le, un stade réversible (Tuso, P. 2014).

Ainsi, l'objectif de ce travail était d'évaluer les effets d'une supplémentation avec Totum-63 sur le développement des symptômes associés au prédiabète chez la souris HF. Les ébauches d'explications mécanistiques qui constituaient les hypothèses mécanistiques des expérimentations précédentes étaient investiguées à nouveau. Il s'agissait notamment de tenter d'expliquer les effets constatés sur la moindre prise de masse grasse et sur l'amélioration de l'homéostasie glucidique sur ce nouveau modèle.

8.3.2. Méthodes

8.3.2.1. Animaux

A leur arrivée, les souris C57BL6 âgées de 5 semaines fournies par Janvier Labs étaient placées en cages individuelles et laissées 1 semaine pour familiarisation avec leur nouvel environnement. Les caractéristiques détaillées des animaux et de leurs conditions d'hébergement sont décrites en paragraphe §6.1. Suite à l'acclimatation, les animaux étaient répartis dans les groupes CON (Contrôle, régime standard A03, SAFE Diets, France), HF (Régime riche en graisse 260HF, SAFE Diets, France) et HF-T63 (Régime riche en graisse 260HF supplémenté avec 2,7% de Totum-63). Le détail de la composition des régimes est détaillé en paragraphe §6.1.3. Plusieurs groupes d'animaux ont été utilisés pour tenter de répondre aux différentes questions de recherches :

- Une expérimentation d'une durée de 16 semaines (HF-16S) incluait 36 animaux répartis dans 3 groupes tels que CON (n=12), HF (n=12) et HF-T63 (n=12).
- Une deuxième expérimentation d'une durée de 4 semaines (HF-4S) incluait 24 animaux répartis dans 3 groupes tels que CON (n=6), HF (n=9), HF-T63 (n=9).
- Enfin, une troisième expérimentation d'une durée de 13 semaines (HF-ON/OFF) incluait 42 animaux répartis tels que CON (n=6), HF (n=12), HF-T63 (n=12) et HF-T63-ON/OFF (n=12). Pour cette dernière, le groupe HF-T63-ON/OFF présentait la particularité de se voir interrompre la supplémentation après 7 semaines (OFF) pour une durée de 3 semaines, avant une reprise de celle-ci (ON) pour une durée de 3 semaines.

Une représentation schématique des expérimentations est proposée en Figure 26, avec les différents tests qui ont été réalisés. Le rationnel de l'enchaînement de ces différentes expérimentations s'explique par les résultats successifs obtenus au cours de chaque phase, qui a amené successivement des questions de recherches nouvelles. Ainsi, c'est dans la partie « résultats » que les objectifs spécifiques et leurs rationnels associés seront détaillés. La présentation chronologique des études reste disponible en Figure 20.

Les animaux bénéficiaient d'un accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*, avant d'être mis à jeun pendant 6h puis mis à mort par décapitation. Les tissus étaient alors soigneusement prélevés (gastrocnémien, soléaire, foie, tissu adipeux sous cutané inguinal) et congelés dans de l'azote liquide immédiatement après dissection.

8.3.2.2. Procédures in vivo

Masse et prise alimentaire

La masse et la prise alimentaire des animaux étaient mesurées chaque semaine.

Composition corporelle

La masse maigre et la masse grasse étaient mesurées par imagerie quantitative par résonance magnétique (EchoMRI, Echo Medical Systems, Houston, Texas), selon la méthode décrite en paragraphe §6.2.1

Glycémie et insulïnémie

La glycémie et l'insulïnémie étaient mesurées après une mise à jeun de 6h, à partir d'un prélèvement de sang au bout de la queue. Le glucose était dosé directement à partir de 0,6µL de sang total à l'aide d'un glucomètre Stat Strip Xpress® (Nova Biomedical, Royaume-Uni), selon la méthode décrite en paragraphe §6.2.4 : *Mesure de la glycémie*. Pour le dosage de l'insuline, environ 30µL de sang total était récupéré dans un tube Microvette® (Starstedt, Allemagne) traité à l'EDTA puis centrifugé à 2000g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant (plasma) était récupéré et congelé à -80°C jusqu'à analyse. L'insuline était dosée grâce à un kit ELISA fourni par Alpco (Alpco Diagnostics, Etats-Unis) selon le protocole décrit en paragraphe §6.4.4.2.

Score HOMA-IR

Le score du modèle d'évaluation homéostatique de la résistance à l'insuline (HOMA-IR) était adapté de la méthode de Matthews *et al.* (1985), réalisée à partir de mesures de glycémie et d'insulïnémie sur du plasma. Dans notre travail, l'insulïnémie était mesurée sur plasma et la glycémie sur sang total. Le score HOMA-IR était ainsi défini tel que :
$$HOMA - IR = \frac{Insuline (mU.l^{-1}) * Glucose (mg.dl^{-1})}{405}$$

Cette méthode permet le calcul d'un score corrélé au degré d'insulïnorésistance systémique, chez l'être humain (Matthews, D. R. *et al.* 1985). Ce modèle a également été validé chez l'animal, et permet la comparaison de groupes entre eux (Cacho, J. *et al.* 2008). L'utilisation du sang total au lieu du plasma pour la mesure de glycémie entraîne une sous-estimation, par rapport à la glycémie plasmatique, d'environ -13% (Holtkamp, H. C. *et al.* 1975). Ceci constitue une dérive qui influe sur la valeur brute du score, mais qui laisse toujours la possibilité de comparer les animaux entre eux-mêmes.

Test oral de tolérance à l'insuline (ITT)

L'ITT était réalisé selon la méthode décrite en paragraphe §6.2.5 : *Test de tolérance intrapéritonéal à l'insuline (ITT)*. La glycémie était monitorée pendant 60 minutes suivant une injection intrapéritonéale

d'une solution d'insuline (0,75 U/kg de masse maigre) sur les souris préalablement mises à jeun depuis 6 heures. La glycémie était mesurée avant intervention (0), puis 15, 30, et 60 minutes après, grâce à un prélèvement de sang total réalisé au bout de la queue de l'animal. Pour s'affranchir de l'effet d'une glycémie basale différente entre les groupes, les valeurs de glycémie sont exprimées nettes, c'est-à-dire après soustraction à chaque temps de mesure de la valeur basale.

Test oral de tolérance au glucose (OGTT)

L'OGTT était réalisé selon la méthode décrite en paragraphe §6.2.6 : *Test oral de tolérance aux glucides (OGTT)*. La glycémie était monitorée pendant les 2 heures suivant un gavage oral d'une solution de glucose (2,3 g/kg de masse maigre) sur les souris préalablement mises à jeun depuis 6 heures. La glycémie était mesurée avant intervention (0), puis 15, 30, 60, 90 et 120 minutes après, grâce à un prélèvement de sang total réalisé au bout de la queue de l'animal. L'insulinémie était mesurée avant (0) puis 15 et 60 minutes après le gavage, grâce à un prélèvement de sang total réalisé au bout de la queue de l'animal. Le sang total était récupéré dans un tube Microvette® (Starstedt, Allemagne) traité à l'EDTA puis centrifugé à 2000g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant (plasma) était récupéré et congelé à -80°C jusqu'à analyse, selon le protocole décrit en paragraphe §6.4.4.2.

Pour s'affranchir de l'effet d'une glycémie basale différente entre les groupes, les valeurs de glycémie sont exprimées nettes, c'est-à-dire après soustraction à chaque temps de mesure de la valeur basale. L'insulinémie est affichée en valeurs brutes (sans soustraction de la valeur basale). L'aire sous la courbe (AUC) brute de l'insuline produite en réponse à l'OGTT était calculée à l'aide du logiciel Prism V7.0 (GraphPad software, USA).

Mesure de l'énergie résiduelle restante dans les selles

L'énergie résiduelle restante dans les selles était évaluée selon la méthode décrite en paragraphe §6.2.3 : *Estimation de l'efficacité apparente d'absorption énergétique*, grâce à un appareil IKA C200 (IKA, Allemagne). L'efficacité apparente d'absorption énergétique (EAAE) était définie selon la formule suivante, l'énergie contenue dans les urines étant négligée car considérée comme inférieure à 2% de la balance totale (Moir, L. *et al.* 2011) :

$$EAAE (\%) = \frac{\text{Energie ingérée (kJ/j)} - \text{Energie restante dans les selles (kJ/j)}}{\text{Energie ingérée (kJ/j)}}$$

Mesure de la dépense énergétique sur 24h

La dépense énergétique était évaluée à partir des mesures du volume d'oxygène consommé ($\dot{V}O_2$) et du volume de dioxyde de carbone rejeté (VCO_2), mesurés chez nos animaux avec un système de cages

calorimétriques TSE PhenoMaster/LabMaster (Bad Homburg, Allemagne), à 22°C. La méthode complète est décrite en en paragraphe §6.2.2.

Injection aigue d'insuline avant mise à mort

Dans l'expérimentation qui durait 16 semaines les animaux recevaient une injection intrapéritonéale d'insuline (4,6 U/kg de masse maigre) ou un volume similaire de véhicule (NaCl 0,9%) 10 minutes avant la mise à mort, afin d'activer les voies de signalisation de l'insuline dans les tissus cibles. Ceux-ci étaient récoltés et congelés immédiatement, tel que décrit plus haut.

8.3.2.3. Collecte de sang et paramètres plasmatiques

Après décapitation, le sang total était recueilli immédiatement après la mise à mort de la souris, collecté dans un tube Microvette® (Starstedt, Allemagne) traité à l'EDTA puis centrifugé à 2000g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant (plasma) était récupéré et congelé à -80°C jusqu'à analyse.

Les triglycérides plasmatiques, triglycérides hépatiques et acides gras non-estérifiés plasmatiques étaient mesurés selon les méthodes décrites respectivement en paragraphe §6.4.4.4, paragraphe §6.4.4.5 et paragraphe §6.4.4.3.

8.3.2.4. Mesures de l'activité enzymatique CS et β -HAD

Vingt-cinq mg de tissu adipeux sous-cutané inguinal étaient homogénéisés dans 20 volumes de buffer, tel que décrit en paragraphe §6.4.3, afin d'évaluer l'activité des enzymes CS et β -HAD, selon le protocole décrit en paragraphe §6.4.3.

8.3.2.5. Western-Blot

Les protéines des muscles gastrocnémien, soléaire, foie ou tissu adipeux sous-cutané étaient extraites selon le protocole décrit en paragraphe §6.4.1.1. Pour le western blot, 10 μ g de protéines étaient déposées. Le protocole et les spécificités des anticorps sont décrits en paragraphe §6.4.1 : Quantification du niveau d'abondance des protéines par western Blot.

8.3.2.6. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm erreur standard à la moyenne. Le détail du choix des tests statistiques est explicité en paragraphe §6.5: Statistiques.

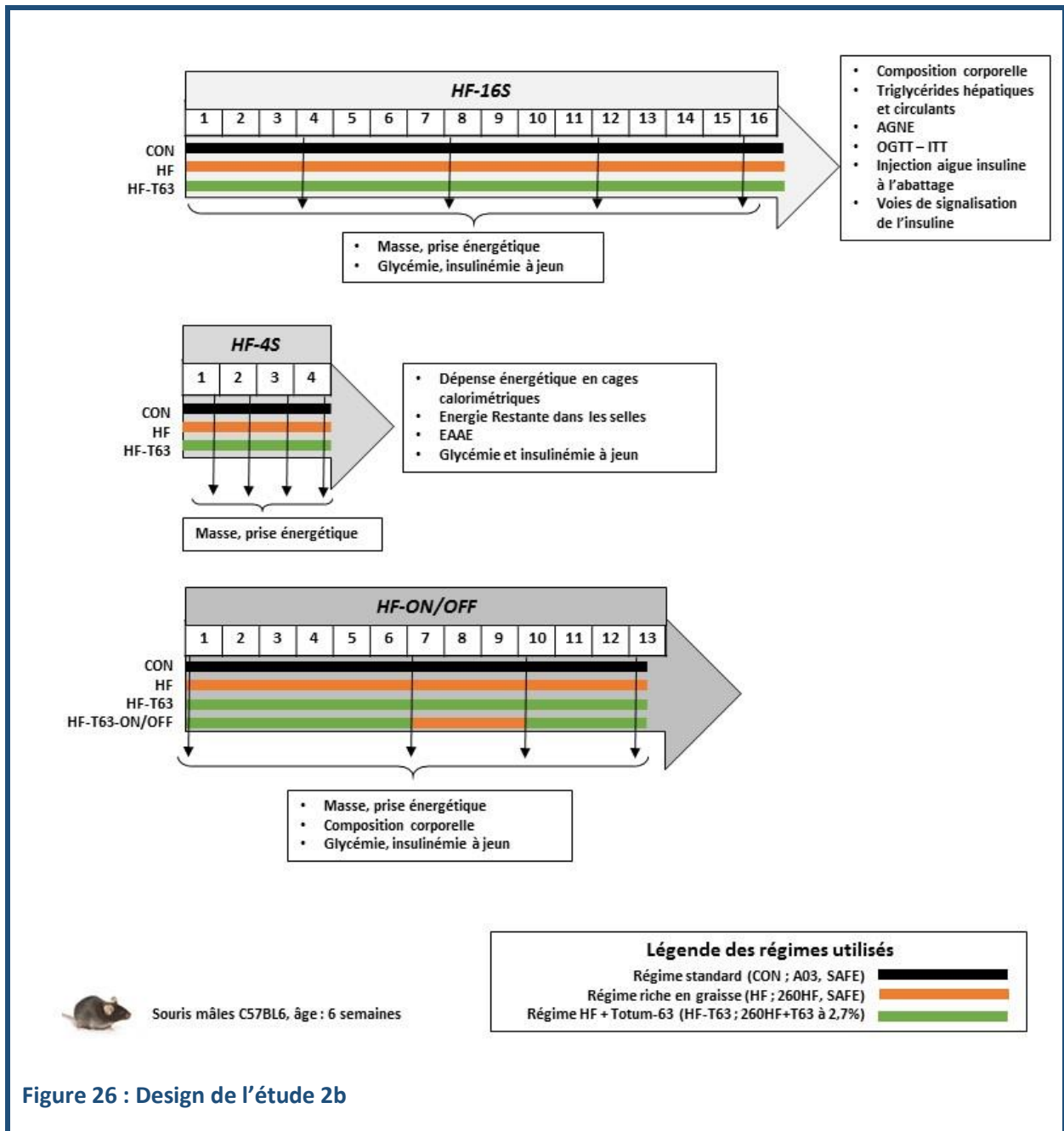


Figure 26 : Design de l'étude 2b

8.3.3. Résultats Expérimentation HF-16S

Afin de vérifier l'effet de Totum-63 sur ce modèle de souris HF, cette première expérimentation était réalisée sur une durée de 16 semaines et comprenait des tests de composition corporelle, un monitoring de la glycémie et de l'insulïnémie à jeun, des tests de tolérance au glucose et à l'insuline, et une injection aigue d'insuline 10 minutes avant l'abattage afin d'explorer les voies de signalisation de l'insuline dans les tissus cibles par western-blot (cf. Figure 26 : Design de l'étude 2b).

8.3.3.1. Prise énergétique et composition corporelle

Le régime riche en graisse (HF) a entraîné un gain de masse par rapport au groupe CON, nourri avec un régime standard ($43,78 \pm 1,39$ g vs. $30,27 \pm 0,92$ g après 16 semaines d'expérimentation ; $p < 0,0001$). La supplémentation du régime HF avec T-63 a fortement limité cette prise de poids, en comparaison à HF ($33,91 \pm 1,95$ vs. $43,78 \pm 1,39$ g après 16 semaines d'expérimentation ; $p < 0,001$) (Figure 27 C et D). La prise énergétique était non différente entre les groupes HF et HF-T63 (Figure 27 A et B.) Après 16 semaines de régime HF supplémenté avec T63, la masse des souris du CON et HF-T63 n'était pas significativement différente, malgré une prise énergétique supérieure dans le groupe HF-T63 en comparaison au groupe CON, ($14,72 \pm 0,71$ kcal/j vs. $11,1 \pm 0,19$ kcal/j ; $p < 0,01$, Figure 27 B). Cet écart de prise de masse s'explique par une diminution de la masse grasse dans le groupe HF-T63, en comparaison à HF ($16,07 \pm 1,07$ g vs. $8,35 \pm 1,27$; $p < 0,0001$), la masse maigre n'étant pas affectée (Figure 27 E et F).

8.3.3.2. Contrôle glycémique

Le régime riche en graisse a entraîné une hausse modérée de la glycémie à jeun dans le groupe HF en comparaison au groupe CON, dès la 8 semaine et jusqu'à la fin du protocole (à la 16^e semaine, $201,67 \pm 6,94$ mg/ml vs. $155,16 \pm 6,33$ mg/ml ; $p < 0,001$). Le groupe HF-T63 présente un profil glycémique intermédiaire avec à la 16^e semaine, une glycémie à jeun de $180,79 \pm 11,90$ mg/ml située entre CON et HF, qui n'était significativement différente d'aucun des deux groupes (Figure 27 G).

L'insulinémie à jeun était significativement plus élevée après 16 semaines d'expérimentation dans le groupe HF, en comparaison aux groupes HF-T63 et CON ($5,39 \pm 0,92$ ng/ml vs. $2,61 \pm 1,02$ ng/ml et $1,00 \pm 0,13$ ng/ml ; $p < 0,001$ et $p < 0,0001$, respectivement). Aucune différence significative n'existait entre HF-T63 et CON.

De manière similaire, le score d'insulinorésistance (modèle HOMA-IR) était significativement plus élevé après 16 semaines d'expérimentation dans le groupe HF, en comparaison aux groupes HF-T63 et CON ($p < 0,001$ et $p < 0,0001$, respectivement). Aucune différence significative n'était mise en évidence entre HF-T63 et CON, suggérant le maintien d'un contrôle glycémique normal dans le groupe supplémenté, malgré l'exposition au régime riche en graisse.

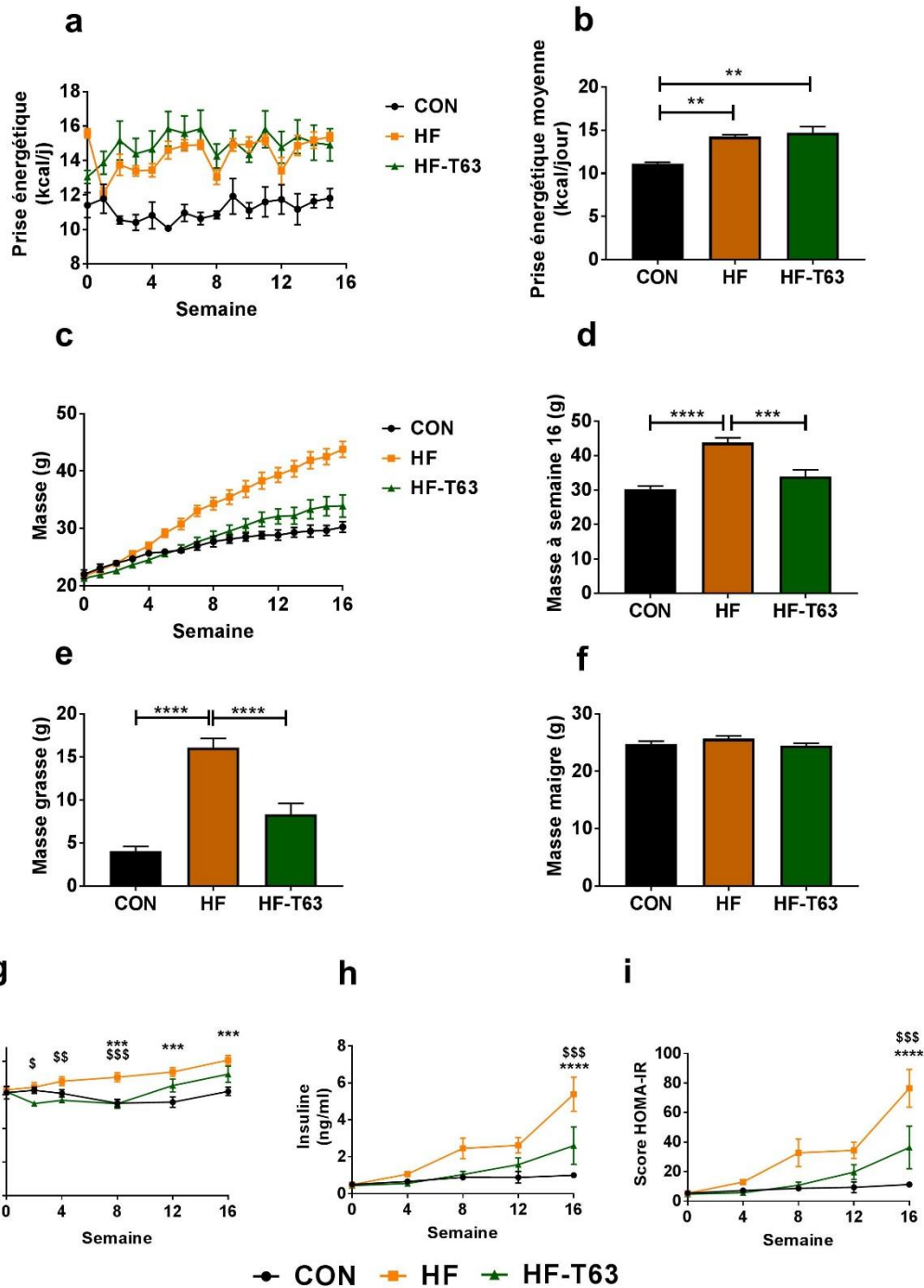


Figure 27 : Etude 2b – HF-16S. Prise alimentaire, composition corporelle et contrôle glycémique.

Evolution de la prise énergétique (a) et prise énergétique moyenne sur les 16 semaines d'expérimentation (b). (c) Evolution de la masse corporelle et comparaison de la masse corporelle à la 16^e semaine d'expérimentation (d). (e) Masse grasse et masse maigre (f), après 16 semaines d'expérimentation. ANOVA à 1 voie suivie d'un test post-hoc de Tukey. (** p<0,01 ; *** p<0,001 ; **** p<0,0001). Evolution de la glycémie à jeun (g), de l'insulinémie à jeun (h) et du score HOMA-IR (h). ANOVA à mesures répétées suivie d'un test post-hoc de Tukey. \$ Significativement différent de HF-T63 (p<0,05 ; \$\$ p<0,01 ; \$\$\$ p<0,001) *** significativement différent de CON (p<0,001 ; **** p<0,0001). Les données sont présentées telles que moyenne ± erreur standard.

8.3.3.3. Triglycérides hépatiques, circulants et acides gras libres

Le régime HF a provoqué une augmentation significative de la quantité de triglycérides hépatiques dans ce groupe vs. CON et HF-T63 ($32,37 \pm 2,70$ mmol/mg de tissu vs. $14,58 \pm 3,37$ et $21,38 \pm 3,51$ mmol/mg de tissu, $p < 0,0001$ et $p < 0,001$, respectivement ; Figure 28 A). Aucune différence n'était notée entre les groupes en ce qui concerne les triglycérides plasmatiques circulants ou les acides gras non-estérifiés plasmatiques (AGNE) (Figure 28 B et C)

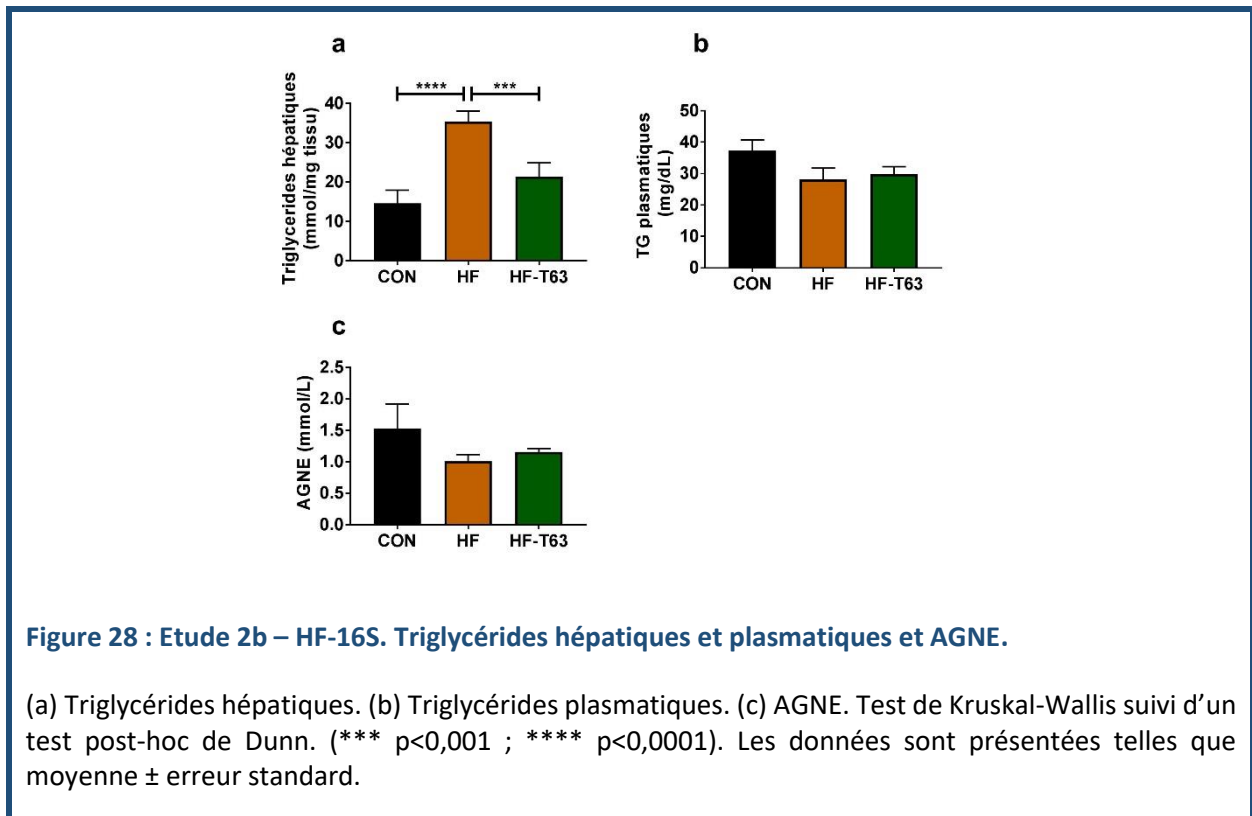


Figure 28 : Etude 2b – HF-16S. Triglycérides hépatiques et plasmatiques et AGNE.

(a) Triglycérides hépatiques. (b) Triglycérides plasmatiques. (c) AGNE. Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn. (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$). Les données sont présentées telles que moyenne \pm erreur standard.

8.3.3.4. ITT et OGTT

La réponse glycémique suite à un ITT (Figure 29 A) ou un OGTT (Figure 29 B) n'était pas différente entre les groupes. Les valeurs sont présentées ici en valeurs nettes, calculées en soustrayant la glycémie basale de celle relevée à chaque de temps de mesure. Les valeurs glycémiques brutes de l'ITT et l'OGTT n'affichaient pas non plus de différences significatives entre les groupes (données non présentées). La réponse insulinémique suite à l'OGTT a montré un taux d'insuline plasmatique plus élevé 30 mn après le gavage au glucose, dans le groupe HF, en comparaison aux groupes CON ($p < 0,0001$) et HF-T63 ($p < 0,001$; Figure 29 C). De manière similaire, l'aire sous la courbe (AUC) de l'insuline sécrétée en réponse à l'OGTT est significativement augmentée dans le groupe HF, en comparaison aux groupes CON ($p < 0,01$) et HF-T63 ($p < 0,05$; Figure 29 D).

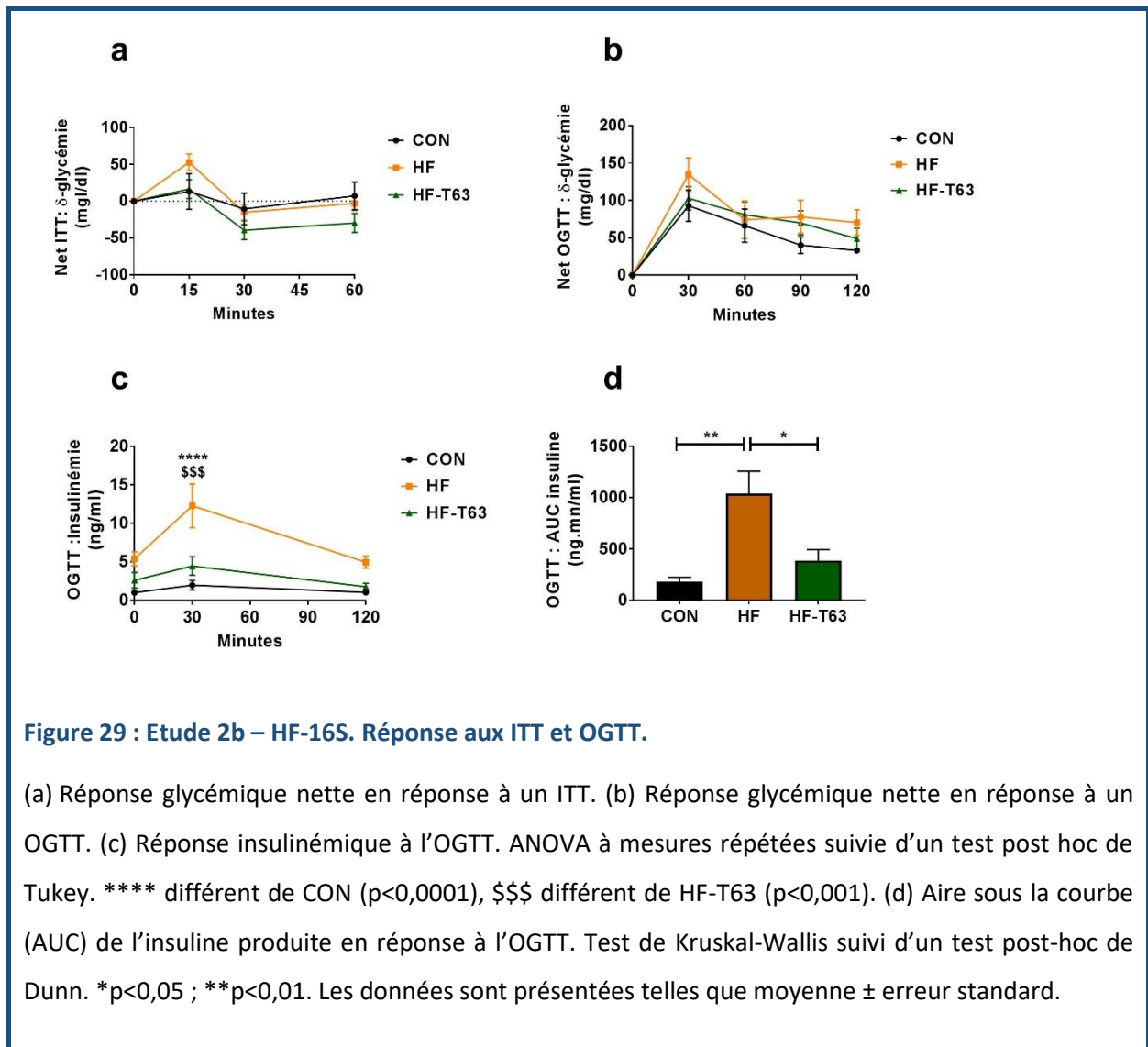


Figure 29 : Etude 2b – HF-16S. Réponse aux ITT et OGTT.

(a) Réponse glycémique nette en réponse à un ITT. (b) Réponse glycémique nette en réponse à un OGTT. (c) Réponse insulinémique à l'OGTT. ANOVA à mesures répétées suivie d'un test post hoc de Tukey. **** différent de CON ($p < 0,0001$), \$\$\$ différent de HF-T63 ($p < 0,001$). (d) Aire sous la courbe (AUC) de l'insuline produite en réponse à l'OGTT. Test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Les données sont présentées telles que moyenne \pm erreur standard.

8.3.3.5. Exploration des voies de signalisation de l'insuline par western-blot

Dans le foie et le muscle gastrocnémien, l'injection aigue d'insuline a engendré une augmentation significative du rapport de phosphorylation d'Akt sur son résidu serine 473 (défini par $p\text{-Akt}_{\text{Ser473}}/\text{Akt}_{\text{total}}$) et thréonine 308 (ANOVA 2 voies, effet insuline $p < 0,0001$), sans distinction possible entre les trois groupes (interaction : NS. Figure 30 A , B, C et D).

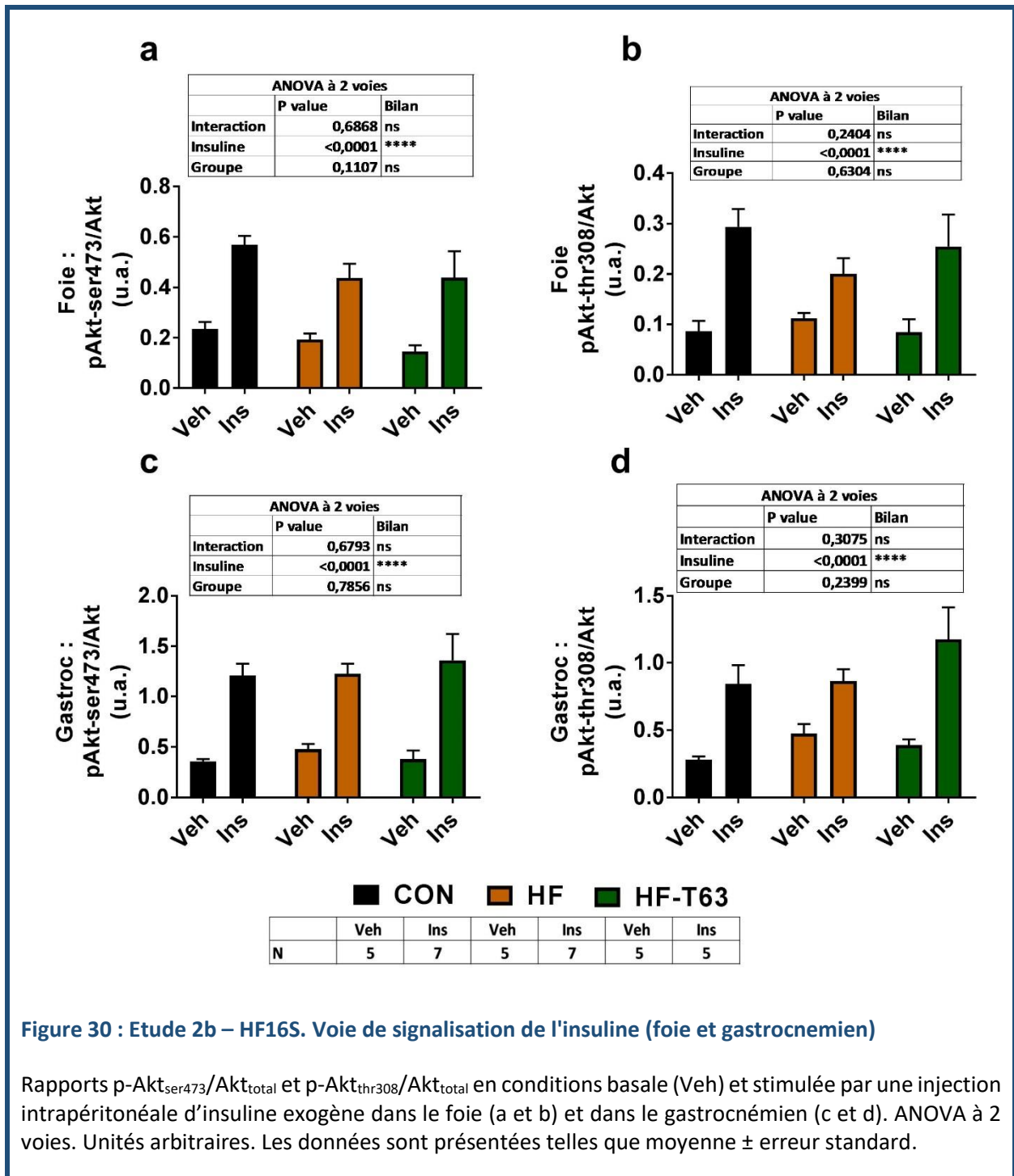


Figure 30 : Etude 2b – HF16S. Voie de signalisation de l'insuline (foie et gastrocnémien)

Rapports $p\text{-Akt}_{\text{ser473}}/\text{Akt}_{\text{total}}$ et $p\text{-Akt}_{\text{thr308}}/\text{Akt}_{\text{total}}$ en conditions basale (Veh) et stimulée par une injection intrapéritonéale d'insuline exogène dans le foie (a et b) et dans le gastrocnémien (c et d). ANOVA à 2 voies. Unités arbitraires. Les données sont présentées telles que moyenne \pm erreur standard.

Dans le soléaire, pour l'injection aiguë d'insuline a engendré une augmentation significative du rapport de phosphorylation d'Akt sur son résidu serine 473 (ANOVA 2 voies, effet insuline $p < 0,0001$), sans distinction possible entre les trois groupes (interaction : NS. Figure 31 A). Pour le résidu thréonine 308, l'interaction était proche du seuil de significativité ($p = 0,0627$) pour le rapport $p\text{-Akt}_{\text{thr308}}/\text{Akt}_{\text{total}}$. Nous avons appliqué un test post-hoc de Bonferroni (effet insuline), qui montre une élévation significative de l'activation d'Akt sur son résidu thréonine 308 dans les groupes CON et HF-T63 seulement ($p < 0,01$; NS dans le groupe HF, Figure 31 B), ce résultat reste à interpréter avec précaution.

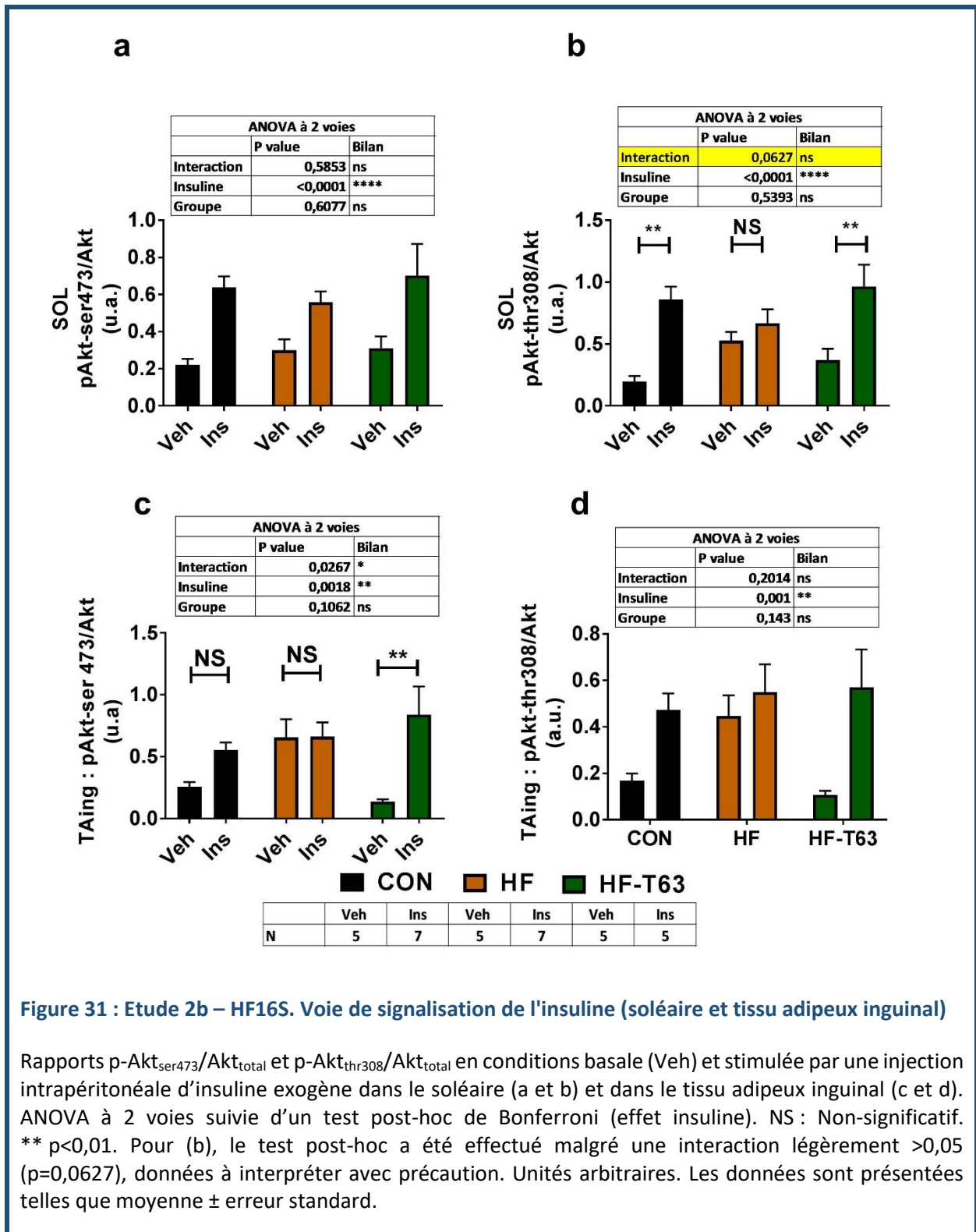


Figure 31 : Etude 2b – HF16S. Voie de signalisation de l'insuline (soléaire et tissu adipeux inguinal)

Rapports $p\text{-Akt}_{\text{ser473}}/\text{Akt}_{\text{total}}$ et $p\text{-Akt}_{\text{thr308}}/\text{Akt}_{\text{total}}$ en conditions basale (Veh) et stimulée par une injection intrapéritonéale d'insuline exogène dans le soléaire (a et b) et dans le tissu adipeux inguinal (c et d). ANOVA à 2 voies suivie d'un test post-hoc de Bonferroni (effet insuline). NS : Non-significatif. ** $p < 0,01$. Pour (b), le test post-hoc a été effectué malgré une interaction légèrement $> 0,05$ ($p = 0,0627$), données à interpréter avec précaution. Unités arbitraires. Les données sont présentées telles que moyenne \pm erreur standard.

Dans le tissu inguinal, l'injection aiguë d'insuline a engendré une augmentation significative du rapport de phosphorylation d'Akt sur son résidu sérine 473 seulement dans le groupe HF-T63 ($p < 0,01$; NS dans les groupes CON et HF, Figure 31 C). Pour le résidu thréonine 308, l'injection aiguë d'insuline a engendré une augmentation significative du rapport de phosphorylation, sans distinction possible entre les groupes (interaction NS, Figure 31 D).

8.3.4. Résultats expérimentation HF-4S

La précédente expérimentation, réalisée sur une durée de 16 semaines, a ainsi confirmé les bénéfices de Totum-63 sur la prise de poids et notamment de masse grasse et sur l'amélioration du contrôle glycémique. Aucune différence n'apparaissait entre HF et HF-T63 sur la prise alimentaire. Ce nouveau protocole a été réalisé suite à ces observations afin de rechercher des explications quant à la moindre prise de poids et de masse grasse, en condition de prise énergétique équivalente. Afin de tester l'hypothèse d'une augmentation de la dépense énergétique due à la supplémentation avec Totum-63, 24 souris réparties dans 3 groupes (CON, HF et HF-T63) ont été placées en cages calorimétriques pendant 48h, lors de leur 4^e semaine d'exposition au régime.

8.3.4.1. Prise énergétique et évolution de la masse

L'exposition à un régime riche en graisse n'a augmenté significativement la prise énergétique moyenne sur les 4 semaines de mesure que dans le groupe HF-T63 vs. CON ($13,54 \pm 0,67$ kcal/j vs. $10,5 \pm 0,31$ kcal/j, $p < 0,01$; Figure 32 A et B). La prise énergétique des souris du groupe HF n'était pas significativement augmentée, par rapport au groupe CON. En conséquence, la masse des animaux du groupe HF n'était pas différente de celles des animaux du groupe CON, après 4 semaines de régime. Le groupe HF-T63 affichait, malgré une prise énergétique moyenne supérieure, une masse significativement différente vs. HF et CON dès la 1^{ère} semaine d'expérimentation ($20,98 \pm 0,43$ g vs. $22,18 \pm 0,45$ g et $22,4 \pm 0,28$ g, $p < 0,05$ et $p < 0,01$, respectivement). Cette différence de masse s'est maintenue au cours des 4 semaines d'expérimentation (Figure 32 C), et s'explique principalement par une importante différence de gain de masse lors de la 1^{ère} semaine d'expérimentation pour le groupe HF-T63, en comparaison aux groupes HF et CON ($+0,07 \pm 0,02$ g/j vs. $+0,12 \pm 0,03$ g/j et $+0,16 \pm 0,03$ g/j, $p < 0,001$ et $p < 0,05$, respectivement). Cette différence n'existait plus lors des 3 semaines suivantes d'expérimentation (Figure 32 D).

8.3.4.2. Glycémie et insulïnémie à jeun

Quatre semaines d'exposition à un régime riche en graisse n'ont pas permis d'augmenter significativement la glycémie à jeun et l'insulïnémie à jeun, dans le groupe HF. La supplémentation avec Totum-63 n'a pas affecté ces paramètres. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre ces trois groupes (Figure 32 E et F).

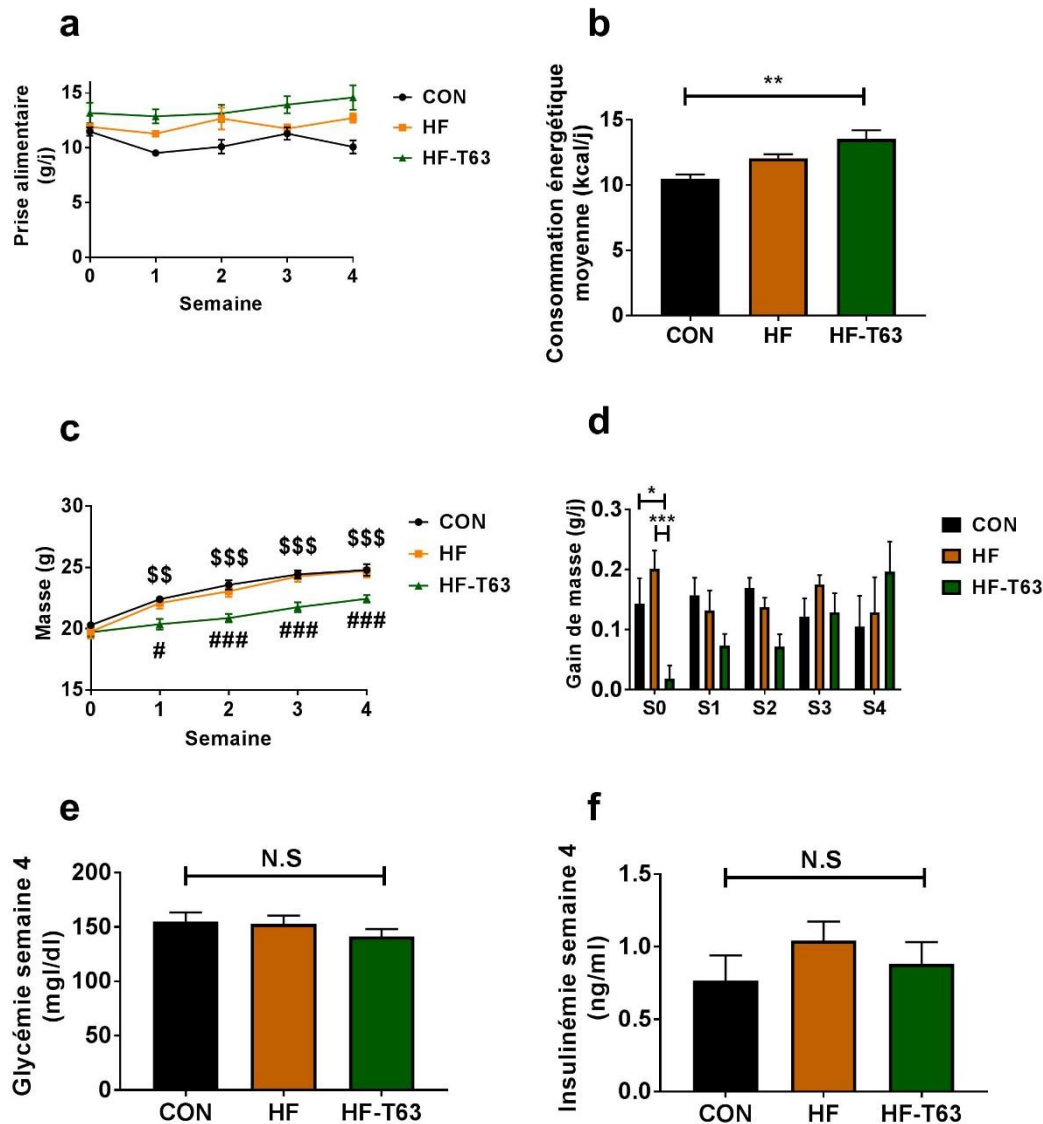


Figure 32 : Etude 2b – HF-4S. Prise énergétique, masse, glycémie et insuliniémie.

(a) Evolution de la prise énergétique lors des 4 semaines d'expérimentation. (b) Prise énergétique moyenne sur la durée totale d'expérimentation. ANOVA à 1 voie suivie d'un test post-hoc de Tukey. ** $p < 0,01$. (c) Evolution de la masse sur les 4 semaines d'expérimentation. ANOVA à mesures répétées suivie d'un test post hoc de Tukey. \$\$ Significativement différent de HF-T63, $p < 0,01$ (\$\$\$ $p < 0,001$). # Significativement différent de CON, $p < 0,05$ (### $p < 0,001$). (d) Gain de masse moyen par jour à chaque semaine d'expérimentation. ANOVA à mesures répétées suivie d'un test post-hoc de Tukey. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. (e) Glycémie et (f) insuliniémie à jeun, en fin de protocole (semaine 4). Test de Kruskal-Wallis et ANOVA à 1 voie, respectivement. Les données sont présentées telles que moyenne \pm erreur standard.

8.3.4.3. Mesure de la dépense énergétique et estimation de l'énergie apparente d'absorption énergétique.

Aucune différence entre les groupes n'a été mise en évidence en ce qui concerne la dépense énergétique des animaux, mesurée sur 24h lors de la 4^e semaine d'expérimentation (Figure 33 A). La mesure de l'énergie restante dans les fèces récoltées pendant la même période met en avant une quantité d'énergie supérieure dans le groupe HF, en comparaison à CON et HF-T63 ($24493 \pm 607,1$ J vs. $17037 \pm 132,2$ J et $1927 \pm 295,8$ J, $p < 0,0001$, respectivement. Figure 33 B). La production de selles sur 24 était significativement diminuée par l'exposition au régime riche en graisse (groupes HF et HF-T63 vs. CON, $p < 0,0001$), mais non-affectée par la supplémentation avec T63 (HF vs. HF-T63). L'EAAE est significativement augmentée par l'exposition au régime HF, en comparaison au groupe CON ($93,38 \pm 0,45$ % vs. $76,45 \pm 1,13$ %, $p < 0,0001$). La supplémentation en T63 a encore significativement augmenté ce rapport, en comparaison au groupe HF ($95,55 \pm 0,28$ % vs. $93,38 \pm 0,45$ %, $p < 0,01$; Figure 33 D).

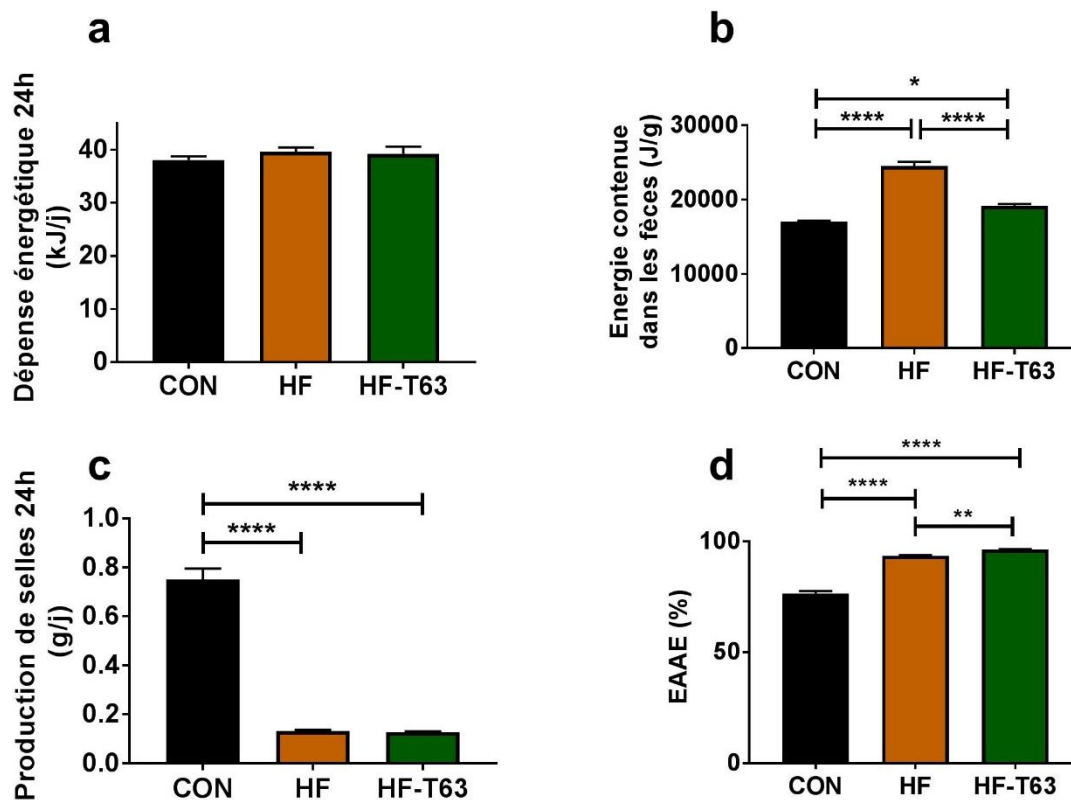


Figure 33 : Etude 2b – HF-4S. Mesure de la dépense énergétique et estimation de l'EAAE.

(a) Dépense énergétique estimée par calorimétrie indirecte sur 24h en chambres calorimétriques. (b) Mesure de l'énergie restante dans les fèces en calorimétrie directe. (c) Production de selles moyennées sur 24h, pendant la période de récolte. (d) Estimation de l'absorption apparente énergétique (EAAE). ANOVA à 1 voie suivie d'un test post-hoc de Tukey. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ **** $p < 0,0001$. Les données sont présentées telles que moyenne \pm erreur standard.

8.3.5. Résultats expérimentation HF-ON/OFF

Lors de l'étude réalisée sur modèle de souris db/db, nous avons montré une mise en place rapide des effets de Totum-63 sur la masse grasse et l'hyperglycémie (dès 2 semaines). Nous n'avons, en revanche, pas d'informations quant à la persistance dans le temps des impacts de la supplémentation sur le métabolisme. Nous avons souhaité répondre ici aux questions suivantes :

- Les adaptations observées perdurent-elles suite à 3 semaines d'arrêt de la supplémentation ?
- Une reprise de celle-ci permet-elle de retrouver un profil métabolique favorable ?

Afin de mesurer l'effet d'un arrêt ou reprise de la supplémentation, un groupe de souris (HF-T63-ON/OFF) était nourri avec un régime HF supplémenté avec Totum-63 pendant 7 semaines, puis passait à un régime HF non supplémenté pendant 3 semaines, puis retournait au régime supplémenté avec Totum-63 pendant 3 semaines (cf. Figure 26 : Design de l'étude 2b). Les mesures de prise énergétique

ont été moyennées entre les semaines 0 et 7, 7 et 10 et 10 et 13, dates auxquelles le groupe HF-T63-ON/OFF voyait son régime changer de HF-T63 vers HF (OFF : semaine 7) ou de HF vers HF-T63 (ON : semaine 10).

8.3.5.1. Evolution du poids corporel

L'exposition à un régime riche en graisse a entraîné une prise de masse corporelle dans le groupe HF, significativement supérieure au groupe CON à partir de la 7^{ème} semaine ($29,04 \pm 0,87$ g vs. $26,00 \pm 0,71$ g, $p < 0,05$). La supplémentation avec Totum-63 a limité cette prise de masse, dès la 7^{ème} semaine de mesure dans les groupes HF-T63-FULL et HF-T63-ON/OFF, en comparaison à HF ($25,07 \pm 0,54$ g et $24,01 \pm 0,39$ g vs. $29,04 \pm 0,87$ g, $p < 0,0001$). Trois semaines d'arrêt du traitement n'ont pas permis de noter de changements significatifs, même s'il semble que la pente de la courbe du groupe HF-T63-ON/OFF s'accroît. Trois semaines de reprise du traitement semblent inverser la tendance observée sur la pente de la courbe HF-T63-ON/OFF, sans qu'il soit possible de noter de différences significatives, ici encore (Figure 34 A). Ces différences de pentes seront investiguées dans la partie suivante, à travers l'analyse des données de gain de poids corporel.

8.3.5.2. Evolution de la masse grasse

La prise de masse corporelle s'explique principalement par une prise de masse grasse, dû à l'exposition au régime riche en graisse. Celle-ci était significativement augmentée dans le groupe HF, en comparaison au groupe CON, dès la 7^{ème} semaine de régime ($5,79 \pm 0,71$ g vs. $2,38 \pm 0,38$ g, $p < 0,001$). La supplémentation avec Totum-63 a limité cette prise de masse, dès la 7^{ème} semaine de mesure dans les groupes HF-T63-FULL et HF-T63-ON/OFF, en comparaison à HF ($2,39 \pm 0,26$ g et $2,05 \pm 0,14$ g vs. $5,79 \pm 0,71$ g, $p < 0,0001$). Trois semaines d'arrêt du traitement n'ont pas permis de noter de changements significatifs, même si, comme pour la courbe de poids corporel, il semble que la pente de la courbe du groupe HF-T63-ON/OFF s'accroît. Trois semaines de reprise du traitement semblent inverser la tendance observée sur la pente de la courbe HF-T63-ON/OFF, sans qu'il soit possible de noter de différences significatives, ici encore (Figure 34 B). Ces différences de pentes seront investiguées dans la partie suivante, à travers l'analyse des données de gain de masse grasse. Les données de masse maigre non pas pu être récupérées à cause d'un problème technique provenant de l'appareil. Toutefois il est probable que celle-ci ait été peu ou pas influencée par le changement de régime, étant donné que la variation de la masse grasse dans le groupe HF-T63-ON/OFF au moment l'arrêt de la supplémentation (OFF) explique près de 70% de la prise de masse totale des animaux.

8.3.5.3. Evolution de la glycémie à jeun

La durée de l'expérimentation n'a pas permis, aux points de mesures choisis, de mettre en évidence une élévation significative de la glycémie à jeun dans le groupe HF, en comparaison au groupe CON. La

supplémentation avec T63 dans les groupes HF-T63-FULL et HF-T63-ON/OFF a toutefois modestement mais significativement réduit la glycémie à jeun de ces animaux, en comparaison à HF, après 7 semaines de supplémentation ($128,18 \pm 6,71$ et $108,33 \pm 6,12$ vs. $157,00 \pm 5,73$ mg/dl, $p < 0,01$ et $p < 0,0001$, respectivement). Trois semaines d'arrêt de la supplémentation dans le groupe HF-T63-ON/OFF a engendré une hausse significative de la glycémie à jeun, en comparaison au point à semaine 7 ($157,67 \pm 5,73$ vs. $108,33 \pm 6,12$ mg/dl, $p < 0,0001$), de sorte qu'elle n'était plus significativement différente du groupe HF, à 10 semaines. Trois semaines de reprise de la supplémentation ont engendré une baisse de la glycémie à jeun des souris du groupe HF-T63-ON/OFF, significativement diminuée par rapport au groupe HF ($137,75 \pm 4,09$ mg/dl vs. $161,55 \pm 5,20$ mg/dl, $p < 0,05$). La glycémie à jeun du groupe témoin HF-T63-FULL est restée significativement inférieure au groupe HF aux 3 points de mesure, pour rappel, à 7, 10 et 13 semaines (respectivement $128,18 \pm 6,71$ mg/dl vs. $157,00 \pm 5,73$ mg/dl, $p < 0,01$; $139,91 \pm 6,98$ mg/dl vs. $164,91 \pm 5,94$ mg/dl, $p < 0,01$ et $161,55 \pm 5,20$ mg/dl vs. $129,00 \pm 8,83$ mg/dl, $p < 0,001$). Les données sont présentées en Figure 34 C.

8.3.5.4. Evolution de l'insulinémie à jeun

Le groupe HF présente une élévation significative de l'insulinémie à jeun en comparaison au groupe CON, dès 7 semaines d'expérimentation, qui s'est accentuée à 10 et 13 semaines (respectivement $1,75 \pm 0,27$ ng/ml vs. $0,69 \pm 0,07$ ng/ml, $p < 0,001$; $1,89 \pm 0,19$ ng/ml vs. $0,78 \pm 0,13$ ng/ml, $p < 0,001$ et $2,43 \pm 0,33$ ng/ml vs. $0,89 \pm 0,22$ ng/ml, $p < 0,0001$). La supplémentation avec T63 dans le groupe de référence HF-T63-FULL a significativement limité la hausse de l'insulinémie, la maintenant à tout point de mesure non-significativement différente du groupe CON et significativement plus basse que celle du groupe HF (semaine 7 : $0,97 \pm 0,14$ ng/ml vs. $1,75$ ng/ml, $p < 0,01$; semaine 10 : $1,04 \pm 0,14$ ng/ml vs. $1,88 \pm 0,19$ ng/ml, $p < 0,01$ et semaine 13 : $1,19 \pm 0,17$ ng/ml vs. $2,43 \pm 0,33$ ng/ml, $p < 0,0001$). De manière similaire, le groupe HF-T63-ON/OFF affichait une insulinémie non-significativement différente des groupes CON et HF-T63-FULL et significativement plus basse que le groupe HF, pendant les 7 premières semaines de supplémentation ($0,71 \pm 0,08$ ng/ml vs. $1,75 \pm 0,27$ ng/ml, $p < 0,0001$). Trois semaines d'arrêt de la supplémentation (OFF) ont provoqué une hausse significative des niveaux d'insuline à jeun dans ce groupe, en comparaison au point à 7 semaines ($1,39 \pm 0,11$ ng/ml vs. $0,71 \pm 0,08$ ng/ml, $p < 0,01$). Aucune différence significative n'était mise en évidence entre T63-HF-ON/OFF et HF à ce moment (10 semaines) de l'expérimentation. Trois semaines de reprise de la supplémentation (ON) ont engendré une baisse de l'insulinémie à jeun dans le groupe HF-T63-ON/OFF, si bien que celle-ci était à nouveau significativement diminuée, en comparaison au groupe HF, à 13 semaines ($0,93 \pm 0,11$ ng/ml vs. $2,43 \pm 0,33$ ng/ml, $p < 0,0001$), et qu'elle n'affichait plus de différence

significative avec le groupe de référence HF-T63-FULL, resté supplémenté pendant toute la période, ni avec le groupe CON. Les données sont présentées en Figure 34 D.

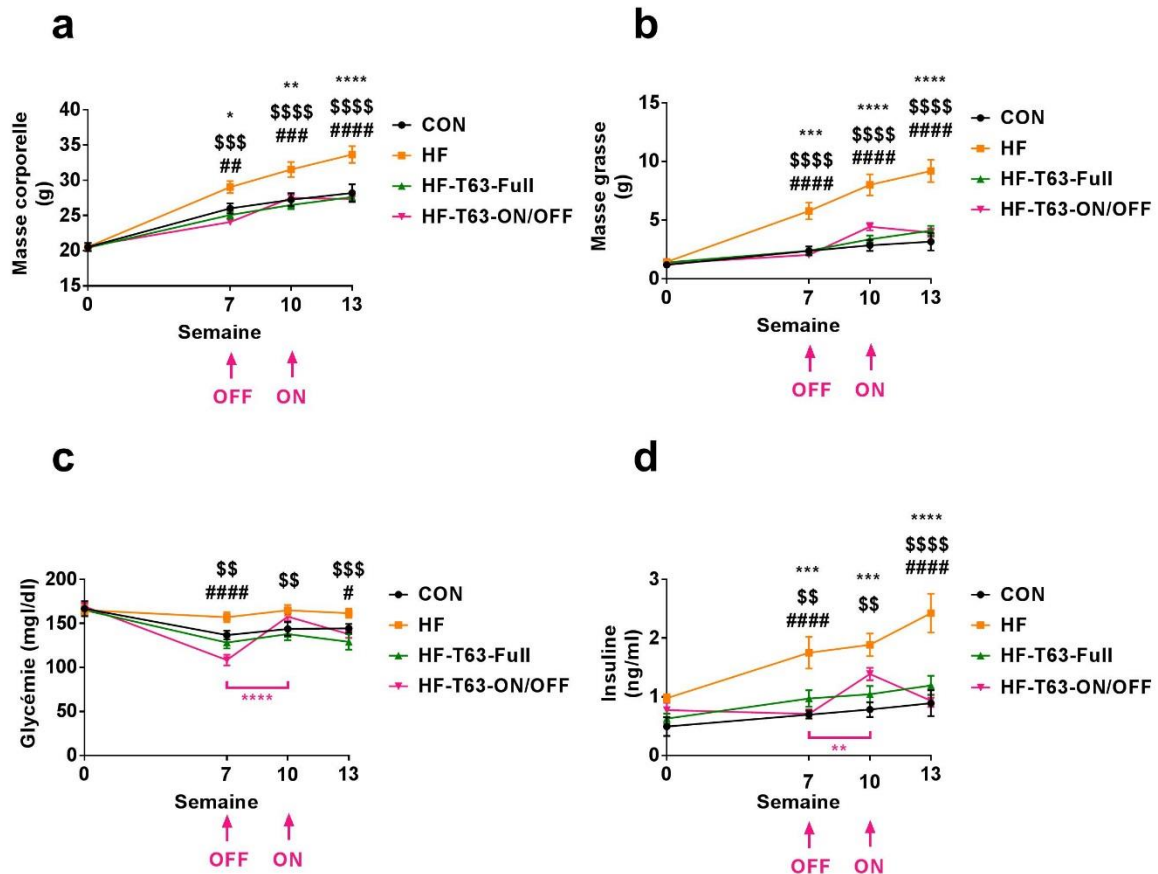


Figure 34 : Etude 2b – HF-ON/OFF. Evolution de la masse, masse grasse, glycémie et insulinémie.

Les mots ON et OFF matérialisent l'arrêt et la reprise de la supplémentation pour le groupe HF-T63-ON/OFF. (a) Evolution du poids corporel. (b) Evolution de la masse grasse. (c) Evolution de la glycémie à jeun. (d) Evolution de l'insulinémie à jeun. ANOVA à mesures répétées suivie d'un test post-hoc de Tukey. * Différent de CON $p < 0,05$ (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). \$\$\$ Différent de HF-T63-FULL $p < 0,01$ (\$\$\$ $p < 0,001$; \$\$\$ $p < 0,0001$). # Différent de HF-T63-ON/OFF $p < 0,05$ (## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$). Les barres horizontales mauves symbolisent un effet temps remarquable sur le groupe HF-T63-ON/OFF (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$). Les données sont présentées telles que moyenne \pm erreur standard.

8.3.5.5. Prise énergétique

Pour des raisons de lisibilité sur les graphiques présentés, seules certaines différences présentant une pertinence particulière pour la discussion des données ont été affichées. Le tableau complet des comparaisons du test Post-hoc de Tukey utilisé est disponible en **paragraphe §11** : Annexes.

Le groupe HF-T63-FULL ne présentait pas de différence au niveau de la prise énergétique, par rapport au groupe HF, aux 3 temps de mesure. De manière similaire, le groupe HF-T63-ON/OFF ne présente pas de différence significative de prise énergétique, en comparaison au groupe HF-T63-FULL. Le groupe HF-T63-ON/OFF affichait une prise énergétique modestement mais significativement inférieure au

groupe HF, lors des 3 semaines de changement de régime versus le régime HF (OFF, $11,69 \pm 0,16$ kcal/j vs. $12,97 \pm 0,31$ kcal/j, $p < 0,05$; Figure 35 A).

8.3.5.6. Evolution du gain de poids corporel

La supplémentation en T63 pendant les 7 premières semaines a significativement diminué le gain de masse des groupes supplémentés HF-T63-FULL et HF-T63-ON/OFF, en comparaison au groupe HF ($+0,58 \pm 0,06$ et $+0,43 \pm 0,05$ g/semaine vs. $+1,06 \pm 0,12$ g/semaine, $p < 0,01$ et $p < 0,0001$, respectivement) sans différence significative apparente entre les deux groupes supplémentés (HF-T63-FULL et HF-T63-ON/OFF). Le changement de régime vers un régime HF (OFF) a provoqué une hausse significative du gain de poids du groupe HF-T63-ON/OFF, lors des 3 semaines de mesure, en comparaison au gain de masse du même groupe mesuré pendant les 7 premières semaines ($+1,44 \pm 0,10$ g/semaine vs. $+0,43 \pm 0,05$ g/semaine, $p < 0,0001$) et en comparaison au groupe HF-T63-FULL (resté supplémenté), mesuré simultanément ($+1,44 \pm 0,10$ g/semaine vs. $+0,47 \pm 0,04$ g/semaine, $p < 0,0001$). Finalement, le retour à 3 semaines de régime supplémenté avec T63 dans le groupe T63-ON/OFF a significativement réduit le gain de masse hebdomadaire des souris de ce groupe, par rapport aux 3 semaines précédentes non-supplémentées ($+0,19 \pm 0,05$ g/semaine vs. $+1,44 \pm 0,10$ g/semaine, $p < 0,0001$), ainsi que le présente la Figure 35 B.

8.3.5.7. Evolution du gain de masse grasse

Les variations provoquées par les changements de régime dans le groupe HF-T63-ON/OFF étaient principalement expliquées par des variations parallèles de la masse grasse, dont le gain hebdomadaire était significativement augmenté 3 semaines après l'arrêt de la supplémentation (OFF : $+0,09 \pm 0,01$ vs. $+0,80 \pm 0,11$ g/semaine, $p < 0,0001$), et également significativement augmenté par rapport au groupe de référence resté supplémenté HF-T63-FULL ($+0,80 \pm 0,11$ g/semaine vs. $0,33 \pm 0,05$ g/semaine, $p < 0,001$). La reprise de la supplémentation pendant 3 semaines a ensuite réduit le gain de masse grasse, par rapport aux 3 semaines non-supplémentées ($+0,02 \pm 0,07$ vs. $+0,80 \pm 0,11$ g/semaine, $p < 0,0001$), ramenant ces valeurs à des niveaux non différents de la moyenne de la période initiale de supplémentation. Ces données sont présentées en Figure 35 C.

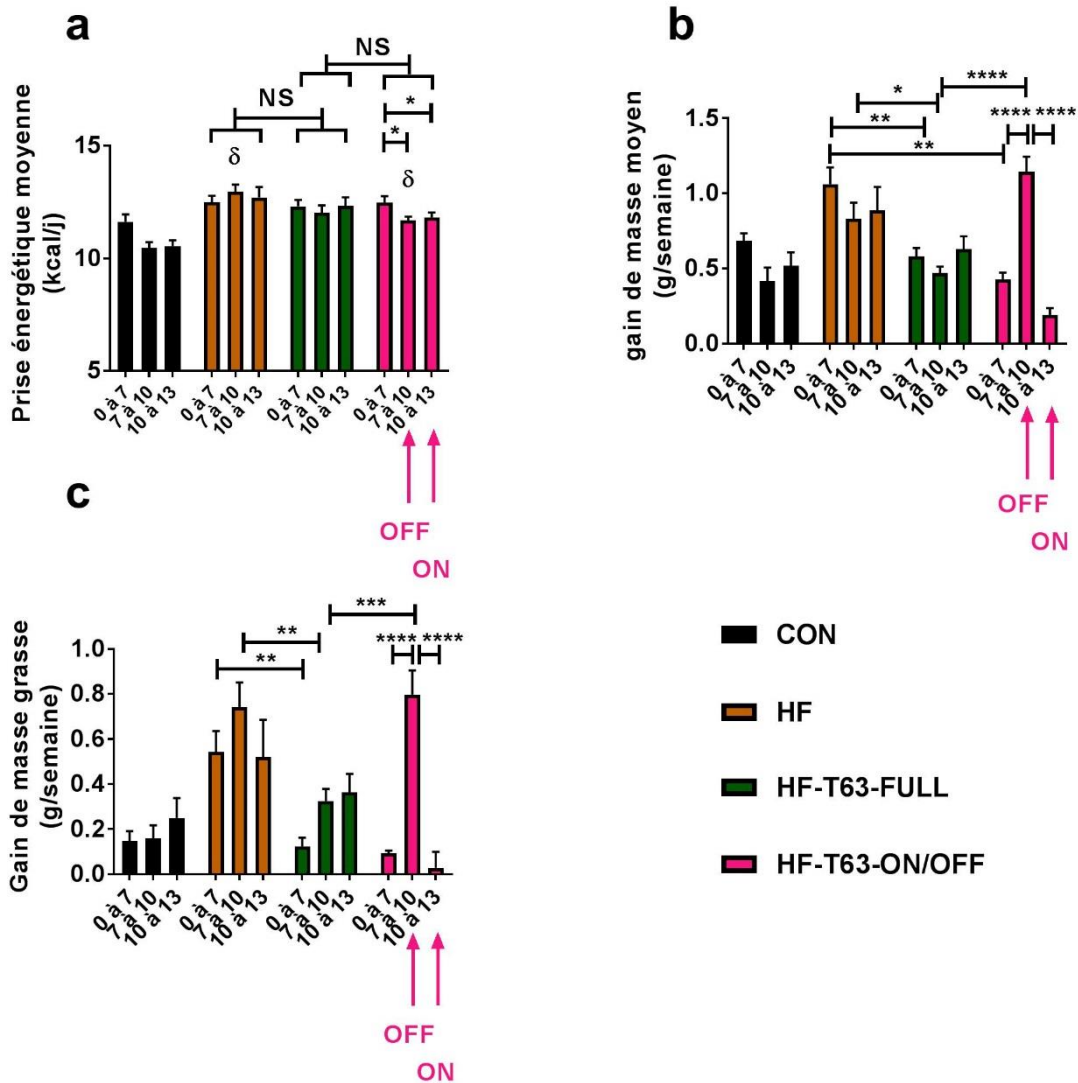


Figure 35 : Etude 2b – HF-ON/OFF. Effet de 3 semaines d’arrêt puis de reprise de la supplémentation avec T63.

Les mots ON et OFF matérialisent l’arrêt et la reprise de la supplémentation pour le groupe HF-T63-ON/OFF. (a) Prise énergétique moyennée entre les semaines 0 à 7, 7 à 10 et 10 à 13. (b) Gain de masse moyen sur les mêmes périodes. (c) Gain de masse grasse moyen sur les mêmes périodes. ANOVA à mesures répétées suivi d’un test post-hoc de Tukey. Le tableau complet des comparaisons du test Post-hoc de Tukey utilisé est disponible en **paragraphe §11 : Annexes**. Sur les différences significatives sélectionnées : δ : différence significative remarquable entre 2 groupes. NS : Non significatif. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. Les données sont présentées telles que moyenne ± erreur standard.

8.3.6. Discussion

Trois expérimentations complémentaires ont ainsi été réalisées sur le même modèle animal du développement du prédiabète : la souris C57BL6 nourrie avec un régime riche en graisse (60% de

l'énergie provenant de matières grasses). La durée d'exposition du régime était variable en fonction des questions de recherches qui étaient posées.

Etape 1 : Etude d'une durée de 16 semaines

La 1^{ère} étape consistait à confirmer les résultats obtenus sur souris db/db concernant les effets de Totum-63, cette fois sur un modèle non-mutant du prédiabète. La durée d'induction de 16 semaines est fréquemment retrouvée dans la littérature pour l'étude de la physiopathologie du prédiabète (Obrosova, I. G. *et al.* 2007; Watcho, P. *et al.* 2010; Shevalye, H. *et al.* 2012), et permet, selon plusieurs revues sur le sujet, d'induire une résistance à l'insuline associée au surpoids, ce qui rapproche ce modèle de la physiopathologie humaine (King, A. J. F. 2012; Islam, M. S. et Venkatesan, V. 2016). Nos résultats obtenus sur ce modèle sont conformes à ceux des études précédemment citées : on note une prise de masse corporelle significative caractérisée par une prise de masse grasse, avec un développement parallèle d'une résistance systémique à l'insuline compensée par une sécrétion accrue d'insuline par les cellules bêta du pancréas (élévation du score HOMA-IR et de l'insulinémie à jeun). La supplémentation avec Totum-63 incorporé directement dans le régime riche en graisse a permis, chez ce modèle, de limiter significativement la prise de masse grasse et donc de poids corporel total, ainsi que le développement de l'insulinorésistance (baisse du score HOMA-IR), principalement grâce à des taux circulants d'insuline moins élevés (la glycémie n'étant pas significativement affectée par le régime HF, après 16 semaines d'exposition, en comparaison au groupe CON). Contrairement aux travaux présentés précédemment sur la souris db/db, la prise énergétique n'était pas affectée par la présence de Totum-63 dans le régime, dans cette étude. Un OGTT réalisé sur ces mêmes animaux a conforté ces données, en montrant que la réponse sécrétoire d'insuline consécutive à un gavage oral en glucose était significativement augmentée, dans le groupe HF, tandis que celle du groupe HF-T63 restait non-significativement différente du groupe CON, pour une réponse glycémique équivalente. Rassemblées, ces données suggèrent le début du développement d'une résistance à l'insuline systémique dans le groupe HF, caractérisé par une production d'insuline compensatoire accrue. La supplémentation avec Totum-63 a amélioré ce paramètre, les niveaux d'insuline circulants à jeun et en réponse à l'OGTT nécessaires au maintien de l'homéostasie glucidique étant moindres.

Le dosage des triglycérides hépatiques dans ce modèle est venu confirmer la tendance observée dans l'expérimentation précédente sur db/db, proche du seuil de significativité, avec cette fois une hausse significative triglycérides dans les foies du groupe HF, qui était abolie par la supplémentation avec Totum-63.

Afin de déterminer quels tissus étaient potentiellement impliqués dans ces adaptations bénéfiques, l'activation d'Akt, une protéine kinase impliquée dans la transmission du signal insulinémique dans de nombreux tissus, aboutissant ultimement à la captation et au stockage du glucose sanguin ou à l'inhibition de la néoglucogenèse (cf. Figure 2 : Voie de signalisation fonctionnelle de l'insuline (schéma simplifié)), a été évaluée par western-blot dans 3 tissus insulino-sensibles suite à une injection aigue d'insuline ou de véhicule. Il a déjà été rapporté une baisse de l'activation de cette protéine, définie par une baisse du rapport de phosphorylation, due au développement de l'insulinorésistance (Karlsson, H. K. R. *et al.* 2005). Nos résultats montrent que le régime HF semble ainsi avoir affecté la capacité de l'insuline à activer Akt dans le tissu inguinal uniquement, avec une tendance similaire dans le soléaire. Dans ces tissus, la supplémentation avec Totum-63 a permis de restaurer l'activation d'Akt stimulée par l'insuline. Il est rappelé que l'activation de cette protéine joue un rôle crucial dans le lien entre la fixation de l'insuline à son récepteur et l'aboutissement de la réponse insulinémique via la translocation des Glut4 (Saini, V. 2010). Ces données suggèrent donc une meilleure capacité à transmettre le signal insulinémique dans le groupe HF-T63 malgré l'exposition au régime HF, et une meilleure insulino-sensibilité dans ces tissus en particulier.

Etape 2 : Etude d'une durée de 4 semaines

Afin de comprendre le mécanisme d'action de Totum-63 sur la moindre prise de masse grasse, une nouvelle expérimentation sur le même modèle a été mise en place sur une durée de 4 semaines. Nos données indiquaient une moindre prise de masse corporelle caractérisée par une moindre prise de masse grasse, la masse maigre restant inchangée. La prise énergétique étant équivalente entre les groupes HF et HF-T63, notre hypothèse était que Totum-63 exerce son action via un mécanisme impliquant soit une dépense énergétique diminuée, soit une absorption intestinale des macronutriments plus basse (ou les deux). Nous avons choisi la durée de 4 semaines afin de ne pas entacher nos mesures d'une surestimation de la dépense énergétique dans le groupe HF dû à une masse supérieure des animaux dans ce groupe. La dépense énergétique est en effet significativement impactée par la prise de masse, via notamment, le coût de la locomotion qui s'en trouve augmenté. A ce temps de mesure, nous espérons visualiser un effet de Totum-63 à un moment où les masses des animaux restaient proches.

L'estimation de la dépense en calorimétrie indirecte réalisée pendant 24h après 4 semaines de supplémentation n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative entre les groupes. La mesure de l'énergie restante dans les selles des animaux met en évidence une différence modeste mais significative dans le sens d'une plus grande EAAE pour le groupe HF-T63, ce qui va donc à l'encontre de notre hypothèse, l'énergie apportée par l'alimentation étant mieux absorbée, dans ce

groupe. Prises ensemble, ces données ne permettent pas d'expliquer l'écart de masse constaté dans le groupe HF-T63, à prise énergétique équivalente. Toutefois, un écueil méthodologique majeur, dans ce travail, empêche de conclure de manière définitive sur l'influence de Totum-63 sur ces deux paramètres. En effet, si la masse des animaux du groupe HF-T63 était bien inférieure à ceux du groupe HF après 4 semaines d'expérimentation, cette différence s'explique par un gain de masse hebdomadaire significativement réduit dans le groupe HF-T63 uniquement pendant la 1^{ère} semaine de supplémentation. Lors du passage en cages calorimétriques (semaine 4), les mesures indiquent que le gain de masse hebdomadaire n'était pas différent entre les deux groupes. A apport énergétique équivalent, il n'est donc pas surprenant d'observer une mesure des « sorties », (ou non-entrées, dans le cas de l'EAAE) énergétiques également non-différentes. Il est également important de noter que 4 semaines d'exposition à un régime riche en graisse n'ont pas permis, dans notre travail, de faire augmenter la masse des animaux du groupe HF par rapport au groupe CON. Egalement, on note que la prise énergétique du groupe HF reste globalement, pendant cette période, proche (et en tous cas, non-significativement différente) du groupe CON. Des données décrivent ainsi peut-être une phase transitoire d'adaptation au régime riche en graisse, pendant laquelle les animaux adaptent leur prise énergétique et leur métabolisme pour « tamponner » la prise de poids. Une étude réalisée par l'équipe de Williams montre en effet que l'exposition à un régime riche en graisse entraîne des altérations métaboliques qui comportent plusieurs phases. Une première phase très précoce d'augmentation aiguë de plusieurs facteurs liés au surplus énergétique (inflammation, perméabilité intestinale), qui précède une phase dite de résolution de ces mêmes paramètres, intervenant dans leurs travaux entre la 1^{ère} et la 12^{ème} semaine d'exposition au régime HF (Williams, L. M. *et al.* 2014). Cette phase transitoire de résolution est ainsi caractérisée par un tampon des altérations liées au surplus énergétique, qui permet aux animaux de s'adapter et de limiter les effets délétères du régime. Ces mêmes auteurs notent toutefois une masse significativement augmentée des animaux, après 4 semaines de traitement, malgré une normalisation des paramètres liés à l'inflammation. Bien que la lignée de souris utilisée par cette équipe ait été la même que celle du présent travail, l'âge des animaux en début d'expérimentation était en revanche, très différent. L'équipe de Williams a utilisé des souris âgées de 12 semaines en début d'étude, contre 6 semaines ici. L'âge de maturation de ce type d'animaux est souvent décrit comme apparaissant autour de 7 semaines (HAGR 2017), ainsi, même si la définition de l'âge adulte reste arbitraire, nos animaux présentaient définitivement un degré de maturation moindre en comparaison aux travaux cités. Les souris étant donc encore en période de croissance, ce paramètre a pu influencer la capacité d'adaptation au régime HF dans le sens d'un tampon plus important du stress apporté par l'exposition au régime, notamment via la prise alimentaire. En effet, celle-ci était diminuée en termes de poids ingéré dans le groupe HF, qui a induit une prise énergétique non-différente entre les groupes HF et CON. La conséquence directe, dans notre travail, est une

absence de gain de masse supplémentaire, dans le groupe HF, en comparaison au groupe CON. De manière similaire, 4 semaines d'exposition au régime HF n'ont pas affecté les paramètres mesurés relatifs au contrôle glycémique (ici : glycémie et insulïnémie à jeun), renforçant l'hypothèse d'un temps d'exposition au régime pathogène trop court. Quoiqu'il en soit, afin de répondre de manière définitive et ferme à la question d'un effet ou non de Totum-63 sur l'absorption énergétique intestinale ou la dépense énergétique, de nouvelles expérimentations sont nécessaires et devront être réalisées dans une période pendant laquelle le gain de masse par unité de temps des souris du groupe HF-T63 est significativement inférieur à celui du groupe HF, pour des apports équivalents.

Etape 3 : Etude arrêt-reprise (ON/OFF)

Nous avons montré que les effets de Totum-63 semblent se mettre en place de façon précoce (dès 2 semaines chez la souris db/db) mais nous n'avons aucune idée de la persistance dans le temps de cet impact sur le métabolisme. La prochaine étape proposait de répondre aux questions liées à la durée de la perdurance de l'effet de Totum-63 après arrêt de la supplémentation, et à l'éventuel retour d'un profil métabolique favorable suite à une reprise de celle-ci.

Afin d'évaluer les effets de 3 semaines d'arrêt et de reprise de la supplémentation avec Totum-63, un lot de souris (groupe HF-T63-ON/OFF) a été exposé à 7 semaines de régime riche en graisse supplémente avec Totum-T63 avant de changer pour un régime HF non-supplémente pendant 3 semaines (phase OFF) puis de revenir au régime HF supplémente pendant 3 semaines (phase ON). Nos données montrent que 3 semaines d'arrêt de la supplémentation entraînent une abolition des effets bénéfiques de Totum-63 sur le gain de masse grasse hebdomadaire moyen, qui redevient équivalent à celui du groupe HF, dans des conditions de prise énergétique similaire. Ceci suggère que l'effet potentiel de Totum-63 sur les sorties d'énergie est complètement aboli après 3 semaines d'arrêt. Parallèlement, nous constatons une élévation de la glycémie et de l'insulïnémie à jeun, après 3 semaines d'arrêt de la supplémentation, pour retrouver, des valeurs se rapprochant de celles du groupe HF, sans les rejoindre totalement. Ceci suggère une abolition partielle (au moins) des effets de Totum-63 sur le contrôle glycémique, après 3 semaines d'arrêt. Si l'on considère la masse grasse absolue (en opposition au gain de masse hebdomadaire, présenté précédemment), on note qu'elle est augmentée dans le groupe HF-T63-ON/OFF après 3 semaines d'arrêt, sans pour autant rejoindre les valeurs du groupe HF. Un excès de masse grasse est considéré comme un facteur de risque important de développer une résistance à l'insuline (Afif, B. A. et Bradford, P. G. 2009). Chez l'homme, l'excès de masse grasse est d'ailleurs un prédicteur de l'insulïnorésistance (Tosi, F. *et al.* 2015). Cette masse grasse augmentée a pu ainsi, dans notre étude, expliquer peut-être une partie de la détérioration des paramètres liés au contrôle glycémique. A l'inverse, 3 semaines de reprise du régime riche en graisse

supplémenté avec Totum-63 ont permis un retour des valeurs de gain de masse grasse hebdomadaire et de glycémie et insulinémie à jeun à des niveaux équivalents au groupe témoin HF-T63-FULL (qui bénéficiait d'une supplémentation en continu), ramenant ces paramètres à des niveaux différents du groupe HF. Chez ce modèle de prédiabète, caractérisé par l'induction de la résistance à l'insuline de souris par l'exposition à un régime riche en graisse, les données obtenues suggèrent ainsi que 7 semaines de supplémentation sont suffisantes pour induire les effets positifs de Totum-63 sur la prise de masse grasse et sur le contrôle glycémique (insulinémie à jeun plus basse). Ces adaptations bénéfiques étaient abolies totalement (en ce qui concerne le gain de masse et de masse grasse hebdomadaire moyen) ou partiellement (contrôle glycémique) après 3 semaines d'arrêt de la supplémentation et totalement rétablies après 3 semaines de reprise de celle-ci. Il est toutefois impossible de déterminer la chronologie précise d'apparition/disparition des effets puisqu'aucune mesure intermédiaire n'a été réalisée, l'apparition ou la disparition des adaptations a pu ainsi se produire plus tôt, de manière progressive ou, au contraire, de manière plus brutale.

Considérées dans leur ensemble, les données de ces 3 études mettent en évidence qu'une période initiale d'exposition à Totum-63 supérieure à 4 semaines semble nécessaire pour l'instauration des adaptations relatives à la limitation de prise de masse grasse sur ce modèle. Nos mesures à cette échéance ne montrent en effet aucune différence entre les groupes au niveau du gain de masse et de masse grasse sur cette période, à prise énergétique équivalente, et donc, assez logiquement, aucune différence au niveau de la dépense énergétique ou de l'absorption intestinale entre les groupes. Après 7 semaines de supplémentation, en revanche, l'effet semble présent, et, s'il est rapidement aboli lors des 3 semaines d'arrêt, il réapparaît rapidement lors des 3 semaines de reprise. Bien que nos mesures après 4 semaines de supplémentation n'aient pas permis de le démontrer, il est toujours possible que les effets de Totum-63 liés à la diminution du gain de masse restent liés à un déséquilibre de la balance énergétique du côté des sorties d'énergie, et/ou à une diminution de l'absorption intestinale de l'énergie. L'augmentation de la dépense énergétique reste donc l'une de nos hypothèses privilégiées, possiblement via une augmentation de la thermogénèse, un effet qui est fréquemment retrouvé lors de l'utilisation de plantes ou de molécules extraites de plantes telles que la caféine (Dulloo, A. G. *et al.* 1989), la capsaïcine issue du piment ou même la pipérine (Westerterp-Plantenga, M. *et al.* 2006), issue du poivre noir et présente dans Totum-63. L'augmentation de la thermogénèse est considéré comme une piste sérieuse pour le traitement des maladies métaboliques liées au surpoids (Betz, M. J. et Enerbäck, S. 2017), et du DT2 (Lizcano, F. et Vargas, D. 2016). Cette piste reste cohérente avec les résultats obtenus ici, puisqu'elle nécessite une mise en place des adaptations à long terme, telles que le « beiging » du tissu adipeux blanc, ainsi qu'une stimulation en aigu du découplage thermogénique. Le « beiging » du tissu adipeux blanc constitue une adaptation de celui-ci caractérisé par une

augmentation de la densité mitochondriale et des facteurs de découplage résultant en une dissipation d'une partie de l'énergie en chaleur, d'où une augmentation de la dépense énergétique (Wu, J. *et al.* 2012). Cette adaptation a été décrite chez la souris suite à des stimuli divers tels que l'activité physique (Stanford, K. I. *et al.* 2015), l'enrichissement de l'environnement dans les cages (Cao, L. *et al.* 2011), et bien sûr l'exposition prolongée au froid (Keipert, S. *et al.* 2017). Une fois cette biogénèse mitochondriale adaptative mise en place, une stimulation du découplage mitochondrial est nécessaire pour provoquer la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur, la seule présence de mitochondries (en l'absence de stimulation) étant insuffisante pour engendrer une dépense d'énergie (Hawley, J. A. et Holloszy, J. O. 2009). Nos prochaines expérimentations devront ainsi tester l'hypothèse d'une mise en place lors des 4 premières semaines du fond adaptatif (« beiging » du tissu adipeux blanc ?), qui provoquerait une hausse de la dépense énergétique lors des semaines suivantes (traduite peut-être, dans ce travail, par une moindre prise de masse mesurée en semaine 7) grâce à la stimulation d'un découplage thermogénique dû à la supplémentation en continu, en cohérence avec l'observation faite de l'arrêt rapide des effets lors de l'arrêt de la supplémentation (arrêt de la stimulation du découplage, malgré la présence du fond adapté) et de la reprise rapide des effets lors de la reprise de la supplémentation (reprise de la stimulation du découplage sur un fond adapté encore présent).

8.4. CONCLUSION GENERALE DE L'ETUDE 2

Ce travail a permis de démontrer l'effet bénéfique d'une supplémentation *per os* de Totum-63 sur deux modèles animaux du prédiabète, la jeune souris db/db et la souris HF, avec à chaque fois, un effet marqué sur la masse corporelle expliquée par une moindre prise de masse grasse, dans des conditions de prise énergétiques équivalentes. L'effet sur la prise alimentaire mis en évidence sur une partie des animaux db/db reste aussi isolé qu'inexpliqué et n'a pas été retrouvé chez le modèle de souris HF. Nos expérimentations n'ont pas permis de mettre en évidence les mécanismes qui sous-tendent ces adaptations, peut-être à cause d'artefacts méthodologiques en lien avec le choix de la période de mesure, qui correspondait, dans notre étude, à une période de prise de masse égale entre les groupes HF et le groupe supplémenté Hf-T63. Toutefois, l'hypothèse privilégiée reste une augmentation de la dépense énergétique, combinée ou non à une moindre absorption intestinale, car nos expérimentations ont démontré une moindre prise de masse grasse dans des conditions de prise énergétiques similaires, significative après 2 semaines de supplémentation chez la souris db/db, et après 7 semaines chez la souris HF. Dans les deux modèles, la masse maigre restait inchangée dans les groupes supplémentés avec Totum-63 en dépit de la forte diminution de la masse totale.

Cette moindre prise de masse grasse s'est accompagnée d'une amélioration du contrôle glycémique, caractérisée principalement par une hyperglycémie réduite chez la souris db/db, et par une hyperinsulinémie réduite chez la souris HF. Afin d'explorer les effets bénéfiques de Totum-63 sur le contrôle glycémique, nous avons confronté les données issues de nos deux modèles du prédiabète afin de proposer quelques hypothèses explicatives. Nous avons notamment observé une divergence entre les modèles au regard de la réponse insulinémique à l'OGTT (réponse augmentée par Totum-63 chez le modèle db/db, diminuée chez le modèle de souris HF). Ces données *a priori* contradictoires trouvent pourtant une explication possible, si l'on s'intéresse au stade d'avancement de la pathologie, très différent entre les deux modèles. Chez le modèle db/db, le groupe pathologique de référence (CON) affiche une incapacité à sécréter de l'insuline en réponse à une charge en glucose, malgré une hyperglycémie très marquée, ce qui suggère une importante dysfonction pancréatique, caractéristique des stades tardifs de la physiopathologie du diabète, qui mènent à l'insulinodépendance (Butler, A. E. *et al.* 2003). Six semaines de supplémentation avec Totum-63 ont permis aux animaux de conserver leur capacité sécrétoire, et donc probablement de retarder l'apparition des symptômes. Les souris de ce groupe se situant probablement toujours dans la phase prédiabétique hyperinsulinémique compensatoire (Donath, M. Y. *et al.* 2005). Cette différence n'existe plus lorsque l'on s'intéresse aux taux d'insuline basaux mesurés à jeun, peut-être parce que ce taux reste artificiellement élevé dans le

groupe CON à cause de la non-utilisation de l'insuline par les tissus cibles, rendus insulino-résistants (Ferrannini, E. *et al.* 2005). En ce qui concerne la capacité sécrétoire préservée par la supplémentation avec Totum-63, deux hypothèses mécanistiques sont émises et seront explorées lors de prochaines investigations. A vu de la composition de la technologie et de son potentiel antioxydant, il est possible que Totum-63 ait un effet direct protecteur sur le stress oxydant, qui constitue l'une des dysfonctions constatées dans la pathologie du DT2, entraînant la mort cellulaire (Krauss, S. *et al.* 2003). Ce point a fait l'objet d'un développement complet en introduction de ce manuscrit, en paragraphe §4.1.4.2. En addition à cela, l'hyperglycémie chronique plus modérée dans le groupe T-63 a pu engendrer un état de glucolipotoxicité moindre dans les cellules bêta, qui constitue également l'un des mécanismes privilégiés de l'altération fonctionnelle du pancréas diabétique (Prentki, M. et Nolan, C. J. 2006), retardant ainsi d'autant l'apparition de la dysfonction sécrétoire dans ce groupe. Le modèle de souris HF ne permet pas de s'avancer aussi tard dans la chronologie de la pathologie. En effet, même après 16 semaines d'exposition au régime pathogène, les animaux restent au stade de prédiabète, caractérisé par une résistance à l'insuline et une hyperinsulinémie compensatoire (King, A. J. F. 2012; Islam, M. S. et Venkatesan, V. 2016). En cohérence avec cela, nous avons observé au cours de nos expérimentations, une réponse insulinémique exagérée dans le groupe témoin pathologique (HF), suite à une charge orale en glucose, par rapport au groupe témoin « sain » (CON). La supplémentation avec Totum-63 montre ainsi un signe d'amélioration de la sensibilité à l'insuline dans la mesure où moins d'insuline était nécessaire au contrôle glycémique pendant l'OGTT.

Si la diminution des triglycérides hépatiques laissait penser que le foie se présentait comme l'un des organes les plus impliqués dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline, nos mesures par western-blot de l'activation la voie de signalisation de l'insuline ont mis en évidence un effet sur le tissu adipeux inguinal, et peut-être, dans le soléaire. Nos mesures sur le gastrocnémien et sur le foie n'ont pas permis de mettre en évidence de différences significatives entre les groupes. Ces postulats sont toutefois à modérer au vu du nombre d'échantillons qui restait faible (5 animaux injectés en véhicule et 5 à 7 en insuline), ce qui a pu limiter la puissance statistique de notre travail. Somme toute, le tissu inguinal semble le plus impacté, et les prochaines expérimentations exploreront des pistes explicatives liées à la levée de l'inhibition du signal insulinémique dans ce tissu en priorité (phosphorylation d'IRS1, facteurs liés à l'inflammation et au stress oxydant tels que JNK, ...).

En conclusion, Totum-63 se place comme un candidat prometteur pour prévenir la progression du prédiabète. Les effets bénéfiques de la formulation ont été confirmés sur 2 modèles animaux, ce qui est encourageant dans la perspective d'une application à l'espèce humaine : les études cliniques ont d'ailleurs, à l'heure où ces lignes sont écrites, été entamées. Enfin, d'autres expérimentations seront nécessaires pour comprendre le mécanisme d'action complet de la formulation.

9. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette thèse était d'étudier l'effet de deux méthodes d'intervention basées sur le mode de vie, l'activité physique et la supplémentation avec un complément nutritionnel, Totum-63, développé par la société Valbiotis, sur la progression du DT2, en ciblant spécifiquement le prédiabète. Les deux méthodes citées faisaient chacune l'objet d'une étude propre avec des modèles animaux du prédiabète parfois partagés.

Etude 1 : Effet de deux modalités d'entraînement physique sur le développement du DT2 de jeunes souris db/db.

Cette étude visait à comparer l'effet de deux modalités d'exercice chronique en endurance, l'entraînement continu à intensité modérée (MICT) et l'entraînement intermittent à haute intensité (HIIT) sur le contrôle glycémique et la fonction mitochondriale musculaire de jeunes souris db/db. Nous faisons l'hypothèse d'un effet bénéfique supérieur du HIIT sur l'homéostasie glucidique, potentiellement causé par une plus grande amélioration de la fonction mitochondriale dans le muscle squelettique.

Cette étude était la première, à notre connaissance, à comparer l'effet de ces deux modalités sur la fonction mitochondriale dans un contexte d'insulinorésistance. Conformément à notre hypothèse et malgré un effet somme tout modeste, le HIIT s'est avéré plus efficace, pour des durées de sessions d'entraînement comparables, pour améliorer le contrôle glycémique de jeunes souris diabétiques db/db (diminution de la glycémie à jeun et de l'hémoglobine glyquée). L'hypothèse d'une implication de la fonction mitochondriale musculaire, dans ce modèle, n'est en revanche pas supportée, car aucune des méthodes d'entraînement n'a amélioré significativement ce paramètre, selon les différents marqueurs mesurés. Ce résultat à première vue surprenant (l'activité physique étant un puissant stimulateur du développement de la fonction mitochondriale musculaire via l'activation du facteur de transcription PGC1- α (Pilegaard, H. et al. 2003) témoigne de la difficulté à obtenir des adaptations à l'exercice dans ce modèle. D'autres équipes avaient suggéré qu'une voie de la leptine efficiente était peut-être nécessaire pour obtenir des adaptations mitochondriales post-entraînement (Li, L. *et al.* 2011). Dans notre étude, un mécanisme indépendant de la fonction mitochondriale et impliquant une augmentation de la capacité d'activation d'Akt stimulée par l'insuline et une hausse de la quantité de Glut4 dans le muscle squelettique, suite à un HIIT, a été mis en évidence. De manière intéressante, l'incapacité d'Akt à se phosphoryler sous l'action de l'insuline dans les tissus cibles représente une des caractéristiques de la physiopathologie de l'insulinorésistance (Saini, V. 2010). Egalement, l'augmentation de la quantité de Glut4 musculaire suite à HIIT est un mécanisme qui a été rapporté chez l'être humain (Perry, C. G. et al. 2008).

Ce travail supporte ainsi l'intérêt de l'utilisation du HIIT pour l'amélioration du contrôle glycémique, dans un contexte d'insulinorésistance caractéristique du prédiabète, même en dépit de l'absence d'améliorations de la fonction mitochondriale musculaire dans ce modèle de jeune souris db/db au développement très rapide de la pathologie.

Afin de confirmer les hypothèses qui ont été avancées dans la discussion de cette étude, le même protocole d'entraînement pourrait être conduit sur d'autres modèles animaux, choisis en fonction de différentes hypothèses ou questions avancées.

Part de l'implication des Glut4 musculaires dans les effets observés

Utiliser un modèle de souris Glut4-KO, spécifiquement dans le muscle pourrait permettre de mettre en évidence la part de l'implication des Glut4 dans la différence observée entre les effets du HIIT et du MICT sur le contrôle glycémique. Si les effets du HIIT sont totalement abolis chez ce modèle, l'hypothèse d'une implication majeure de ces transporteurs serait supportée. Mais d'autres mécanismes adaptatifs consécutifs à l'entraînement pourraient également être mis en lumière car la présence chez ces animaux de mécanismes compensatoires de transport de glucose dans le muscle a déjà été suggérée (Fam, B. C. *et al.* 2012).

Importance de la fonctionnalité de la voie de la leptine

Afin de tester l'hypothèse de la dépendance de la fonctionnalité de la voie de signalisation de la leptine dans les adaptations mitochondriales consécutives à l'entraînement, on peut imaginer de reproduire le protocole expérimental sur un modèle de souris ob/ob, avec ou sans injection exogène de leptine. Contrairement aux souris db/db qui se caractérisent par une absence de récepteurs à la leptine dans les tissus, les souris ob/ob présentent une voie de la leptine fonctionnelle mais une incapacité à produire l'hormone (Ingalls, A. M. *et al.* 1950; Zhang, Y. *et al.* 1994). Certains auteurs avaient montré qu'un signalling de la leptine dysfonctionnel (absence de leptine, dans le cas de la souris ob/ob) entraînait une inhibition partielle de la biogenèse mitochondriale via la voie AMPK-Sirt1 menant à la phosphorylation et la désacétylation de PGC1- α (Li, L. *et al.* 2011). Nous proposons donc de vérifier cette hypothèse sur un modèle de souris ob/ob (déficient en leptine mais en présence de récepteurs et possédant un signalling fonctionnel), soumises à un protocole d'entraînement (ou non) et équipées de pompes dispensant un flux continu et physiologique de leptine (ou de véhicule) (Knight, Z. A. *et al.* 2010).

Modèle de souris (HF)

Nous envisageons également de tester à nouveau les deux modalités d'exercice chronique sur un modèle plus physiologique et non-mutant du prédiabète : la souris HF. Nos expérimentations avec

Totum-63, dans la seconde étude de cette thèse, ont montré que l'état pathologique moins avancé de ce modèle pouvait permettre de mettre en évidence des effets différents ou plus marqués, surtout si l'on s'intéresse aux stades précoces du DT2 caractérisés par le développement de l'insulinorésistance.

A partir de ces nouveaux modèles, il est envisagé de poursuivre les explorations tissulaires qui n'avaient pas pu être réalisées lors de la présente expérimentation. En effet, le timing de prélèvement et les choix des tissus prioritaires avaient été optimisés dans le but de tester notre hypothèse principale de départ, liée à l'adaptation de la fonction mitochondriale et à la voie de signalisation de l'insuline. La plupart des tissus musculaires (d'une quantité relativement faible chez la souris) ont donc été utilisés et les autres tissus ont subi un délai avant congélation relativement long qui pourrait biaiser l'interprétation des résultats de certains dosages, notamment en cas d'évaluation de la phosphorylation de protéines.

Expliquer l'amélioration du signal de l'insuline dans le muscle squelettique

Il est possible de mesurer l'activation de protéines situées en amont d'Akt, dans la voie de l'insuline, afin de fournir une explication à l'effet du HIIT sur la voie de l'insuline. Spécifiquement, IRS-1 possède des résidus sérine (Ser307 par exemple) qui inhibent son activité et des résidus tyrosine (Tyr608 chez la souris ou Tyr612 chez l'humain) qui l'activent. Des voies de signalisation liées au stress cellulaire (JNK ou IKK β /NF- κ B) sont connues pour inhiber IRS-1. De nombreux stimuli peuvent être à l'origine de l'activation de ces voies et faire l'objet d'une investigation : l'implication de dérivés lipidiques intramusculaires tels que les DAG ou les céramides, (Samuel, V. T. et al. 2010), mais aussi l'inflammation (cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α et IL-1 β) ou des marqueurs de stress oxydant (cf. paragraphe §4.1.5).

Voies de l'insuline dans d'autres organes

Si le muscle squelettique est la cible directe des actions mécaniques de l'activité physique, d'autres organes peuvent bénéficier d'adaptations suite à un entraînement, notamment grâce à la fonction endocrine du muscle. Dans le cadre du DT2, l'activation de la voie de l'insuline pourra être évaluée dans d'autres tissus majeurs impliqués dans la régulation du métabolisme du glucose, tels que le foie ou le tissu adipeux. Le dialogue entre le muscle et ces deux organes a d'ailleurs déjà été décrit (Pedersen, L. et Hojman, P. 2012), notamment par le biais de myokines sécrétées à l'exercice (IL-6, irisine, ...), qui pourront également faire l'objet d'un dosage plasmatique.

Implication du microbiote intestinal

Chez la souris, l'exposition à un régime riche en graisse induit une obésité et des modifications de certains paramètres du microbiote intestinal, dont sa diversité et l'abondance de certaines familles par

rapport à d'autres (rapport Bactéroidetes/Firmicutes) (Denou, E. et al. 2016). D'autres travaux avaient d'ailleurs montré que ces altérations jouent un rôle important dans le développement de la résistance à l'insuline (Cani, P. D. et al. 2007). De manière intéressante, le mode HIIT a montré des effets bénéfiques sur le microbiote en modulant positivement ces paramètres, préalablement altérés par plusieurs semaines d'exposition à un régime HF (Denou, E. et al. 2016). Ce mode d'entraînement pourrait ainsi améliorer le microbiote intestinal et, indirectement, contribuer à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline.

Etude 2 : Effet d'une supplémentation avec un complément nutritionnel à base de plantes sur le métabolisme énergétique dans deux modèles du prédiabète, la jeune souris db/db et la souris HF.

Le second objectif de cette thèse était de mesurer l'effet de Totum-63, un complément nutritionnel à base de plantes développé par la société Valbiotis, sur la progression du prédiabète vers le diabète. Pour cela, deux modèles murins du prédiabète ont été utilisés : la jeune souris diabétique db/db et la souris HF. Le premier modèle, commun avec la première étude de cette thèse, présente une évolution rapide de la pathologie, d'un état normal à une obésité accompagnée d'une insulino-résistance, caractéristique du prédiabète, pour terminer à une insulino-déficience, caractéristique du DT2. Le second présente une évolution plus lente et n'atteint pas, avec les durées de protocoles utilisées (maximum 16 semaines d'exposition au régime HF), le stade de l'insulinodépendance. Ces caractéristiques en font un modèle centré sur le prédiabète, complémentaire du précédent. Les effets bénéfiques du complément ont été confirmés sur ces deux modèles, ce qui constitue un élément encourageant dans la perspective d'une application à l'espèce humaine.

1- Un effet pléiotrope de Totum-63 ?

Nos données montrent que Totum-63 a limité la prise de masse grasse sur les deux modèles, cet effet s'accompagnant d'une amélioration du contrôle glycémique caractérisée par une baisse de l'hyperglycémie chez le modèle de souris db/db et une baisse de l'hyperinsulinémie chez la souris HF. Chez la souris db/db, nos données suggèrent également une préservation de la capacité sécrétoire en insuline du pancréas. Chez la souris HF, nos données montrent que l'amélioration de la sensibilité à l'insuline consécutive à la supplémentation avec Totum-63 est expliquée, au moins en partie, par une restauration de celle-ci dans le tissu adipeux inguinal et, peut-être, dans le soléaire *i.e.* un muscle squelettique de type oxydatif. Totum-63 se place ainsi comme un candidat prometteur pour prévenir la progression du prédiabète grâce à une action potentiellement pléiotrope. En effet, ce travail a mis en lumière une action de Totum-63 dans plusieurs organes parmi les plus grandement impliqués dans

la physiopathologie du DT2 (foie, tissu adipeux, muscle squelettique, cellules bêta), ainsi que l'illustre la Figure 36. A l'état actuel d'avancement des travaux, il est impossible de savoir si l'action du complément sur ces tissus est directe, indirecte ou bien correspond à la somme des deux. En effet, comme on l'avait vu en introduction (cf. paragraphe §4.1.8), le dysfonctionnement d'un organe affecte souvent d'autres tissus. Cette communication inter-organes est probablement liée au fait que l'ensemble des organes cités ont une capacité sécrétoire endocrine. L'activité physique est d'ailleurs un bon exemple d'une action mécanique ciblée sur un organe (en l'occurrence : le muscle squelettique) aux effets pléiotropes sur la santé. Sollicité, le muscle sécrète une multitude de myokines qui exercent leur action sur le muscle lui-même, mais également d'autres organes, via la circulation sanguine (Fiuza-Luces, C. et al. 2013). D'autre part, il est possible que des effets parallèles de Totum-63 existent sur des organes qui n'ont pas été étudiés ici. Notamment, certains ingrédients présents dans le complément et son mode d'absorption (*per os*) laissent penser que le microbiote intestinal pourrait être affecté, tel que cela a été montré sur des composés présents dans l'huile d'olive (Prieto, I. et al. 2018) ou dans la myrtille (Lee, S. et al. 2018). On l'a vu plus haut, ce dernier fait l'objet d'un engouement particulier ces dernières années et des relations de causalité avec l'obésité, les pathologies métaboliques et même l'insulinorésistance ont été établies (Cani, P. D. et al. 2007).

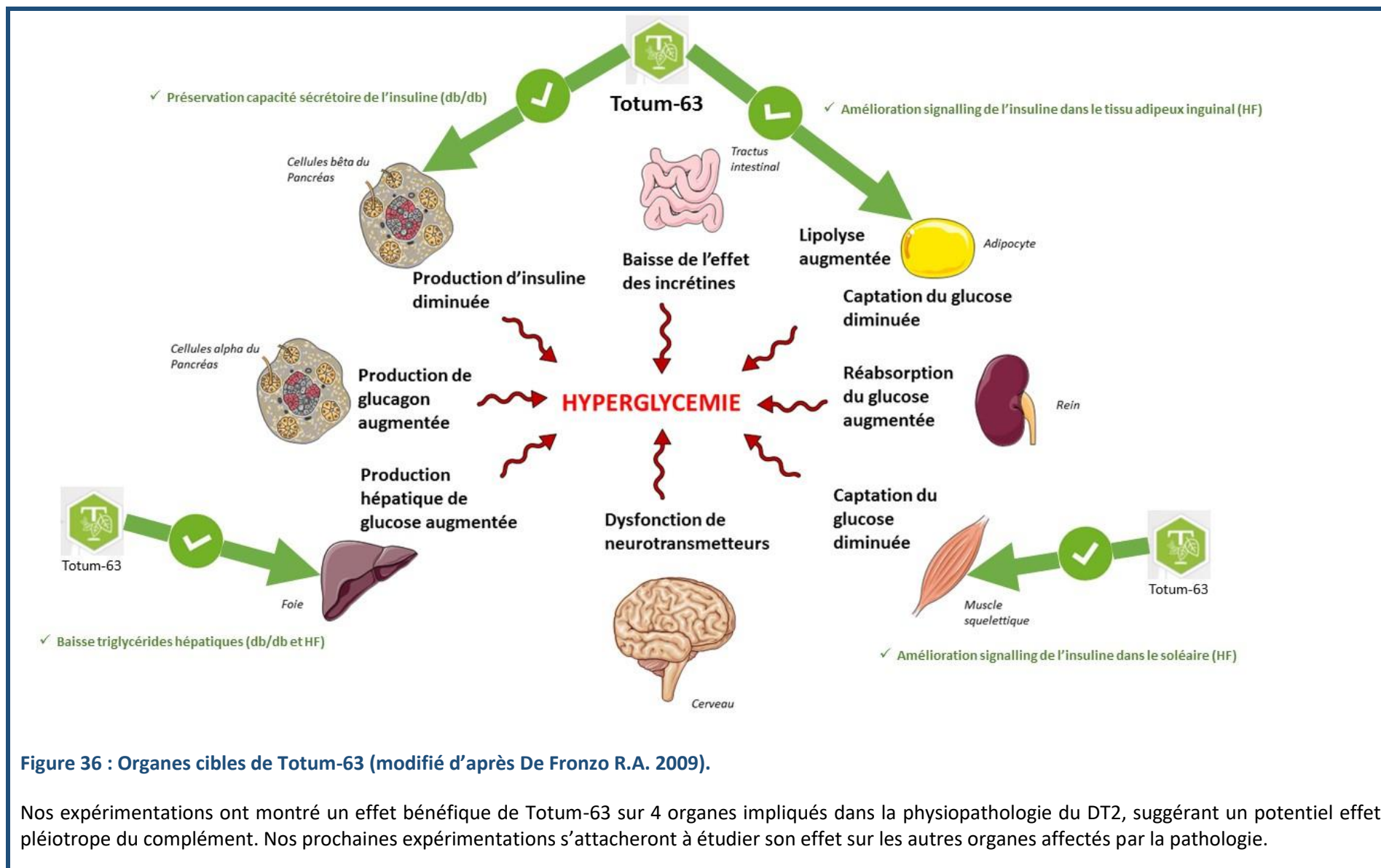


Figure 36 : Organes cibles de Totum-63 (modifié d'après De Fronzo R.A. 2009).

Nos expérimentations ont montré un effet bénéfique de Totum-63 sur 4 organes impliqués dans la physiopathologie du DT2, suggérant un potentiel effet pléiotrope du complément. Nos prochaines expérimentations s'attacheront à étudier son effet sur les autres organes affectés par la pathologie.

2- Quels mécanismes d'action ?

Ce travail a également permis de mettre en lumière quelques hypothèses quant aux mécanismes d'action de Totum-63. L'un de nos critères principaux était l'amélioration du contrôle glycémique, un élément clef du contrôle du DT2 qui constitue d'ailleurs l'objectif de la plupart des traitements pharmacologiques. Si Totum-63 a effectivement permis une amélioration de ce critère, d'autres travaux seront nécessaires pour comprendre l'ensemble des mécanismes impliqués. A l'instar des organes s'affectant l'un l'autre, les mécanismes physiopathologiques menant à l'insulinorésistance sont également imbriqués. Nous avons constaté dans ce travail, sur nos deux modèles, un parallèle entre la perte de poids, plus spécifiquement de masse grasse, et l'amélioration du contrôle glycémique. La perte de masse grasse constitue *per se* un important stimulus pour améliorer l'insulino-résistance (Samuel, V. T. et Shulman, G. I. 2012) notamment grâce à une diminution des dépôts ectopiques de graisse (Bays, H. et al. 2004), dont l'importance a été soulignée dans l'introduction de ce manuscrit (paragraphe §4.1.3.1). La moindre masse grasse observée dans les groupes supplémentés constitue donc probablement l'un des mécanismes explicatifs et constituera l'une de nos hypothèses de travail futures. Les données obtenues sur la sensibilité à l'insuline du tissu adipeux inguinal suggèrent également qu'il est un des tissus les plus bénéficiaires de l'action de Totum-63. Là encore toutefois, il n'est pas possible de savoir si la simple réduction de quantité globale de tissu est responsable des améliorations, ou si d'autres effets s'ajoutent pour augmenter encore la sensibilité à l'insuline.

Plusieurs observations permettent cependant de formuler l'hypothèse selon laquelle Totum-63 présenterait des effets additionnels à ceux liés à la diminution quantitative de la masse grasse :

- 1- Dans nos expérimentations, Totum-63 a augmenté l'activation de la voie de l'insuline dans le tissu adipeux inguinale alors que celle-ci restait inhibée dans le groupe HF et n'atteignait pas le seuil de significativité dans le groupe CON (régime maigre, groupe « sain » de référence). Ces données, recueillies dans des conditions de composition corporelle similaires entre les groupes CON et HF-T63, laissent supposer une action de Totum-63 additionnelle à la perte de masse grasse.
- 2- Les plantes qui constituent le complément nutritionnel possèdent pour beaucoup une action anti-inflammatoire et/ou antioxydante, démontrée par plusieurs études (ainsi que présenté en introduction, cf. paragraphe §4.4.7). L'inflammation et le stress oxydant étant reconnus comme des mécanismes pouvant participer à une inhibition de la voie de l'insuline, nous avons donc ici un mécanisme additionnel potentiel de l'action de Totum-63.

D'autres voies pourraient être impliquées, un schéma des actions putatives du complément nutritionnel, basé sur les données de la littérature, avait été proposé en introduction de cette thèse

(cf. Figure 14). Sur la base de ce schéma, une nouvelle figure révélant les effets confirmés de Totum-63 au cours de cette thèse, ceux restant à investiguer et les liens potentiels existants entre eux, est présentée en Figure 37. D'autres effets potentiels du complément avaient été suggérés de par les végétaux qui le composent, notamment une action possible sur le microbiote intestinal, modulable grâce à l'activité physique, on l'a vu, mais aussi grâce à l'absorption de certains végétaux. Le rôle du microbiote intestinal dans la physiopathologie de l'insulinorésistance a été démontré (Cani, P. D. *et al.* 2007). Egalement, 4 des 5 composants de Totum-63 ont montré un effet sur des enzymes digestives au cours de précédentes études (cf. Figure 14). L'inhibition de certaines d'entre elles est un moyen de diminuer l'absorption d'énergie dans le tractus digestif, et donc d'obtenir des bénéfices sur le métabolisme lipidique et glucidique. Une modification du microbiote intestinal en aval est également plausible, la composition des selles étant modifiée. Ce schéma reste sans doute très réducteur et des synergies d'action sont également potentiellement à l'œuvre, dans l'action globale du complément. Ce postulat est d'ailleurs renforcé par une partie des données issues des expérimentations préliminaires (non présentées dans cette thèse) qui avaient conduit à la formulation de Totum-63. Celles-ci faisaient notamment état d'un effet des ingrédients très faible voire nul, lorsque pris individuellement, mais qui se développait de façon synergique à mesure que l'on approchait de la combinaison finale de 5 végétaux. Le mécanisme d'action de Totum-63 est donc probablement complexe, avec de nombreux effets dus aux multiples composés phytochimiques présents.

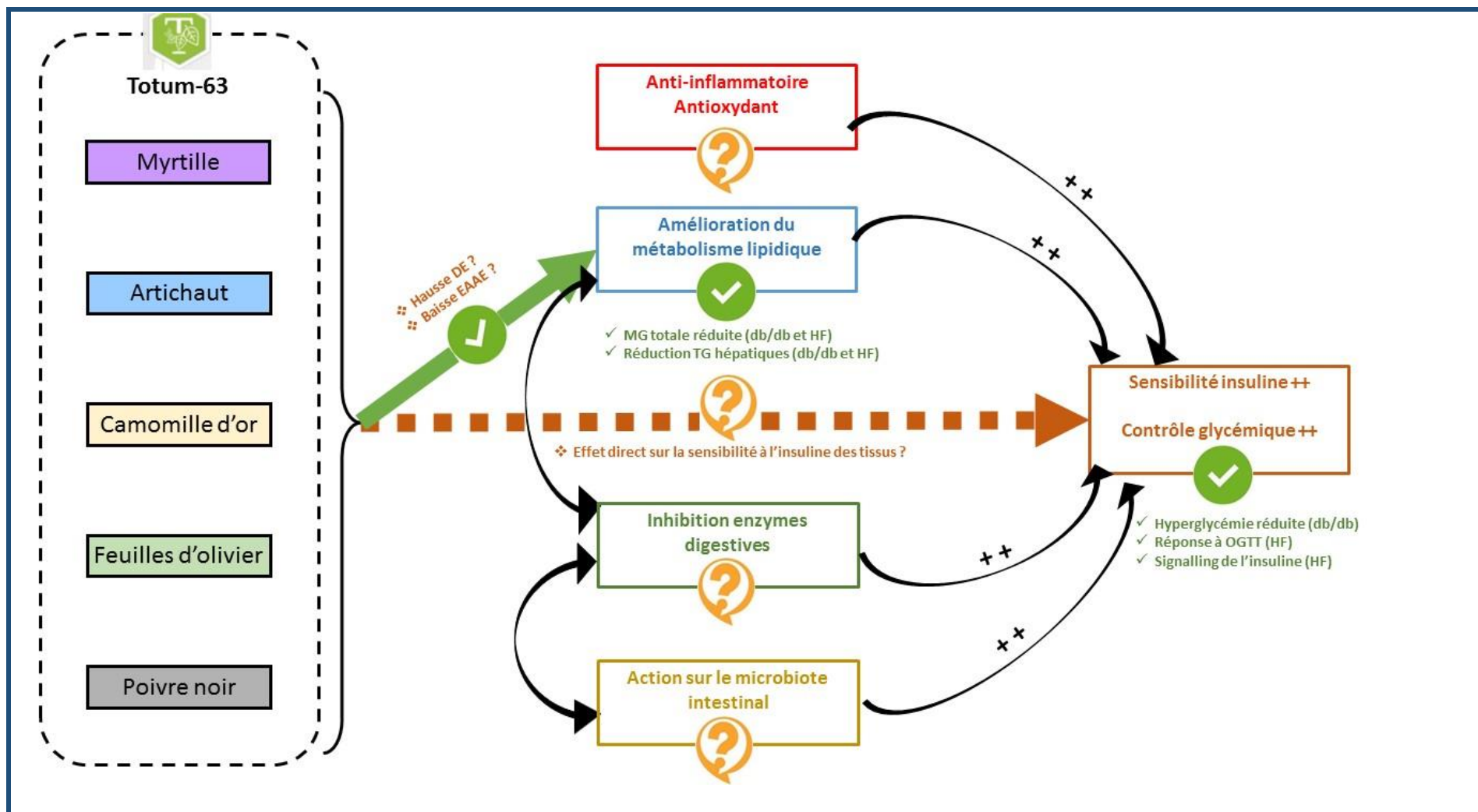


Figure 37 : Mécanismes d'action de Totum-63.

DE : Dépense Energétique. EAAE : Efficacité Apparente d'Absorption Energétique ; MG : Masse Grasse ; TG : Triglycérides ; db/db : modèle de souris db/db ; HF : modèle de souris nourries avec un régime riche en graisse ; OGTT : Test Oral de Tolérance au Glucose.

3- Perspectives de travail

Les perspectives directes de ce travail visent à développer des expérimentations vérifiant l'effet du complément sur l'être humain. Ce travail a déjà débuté, comme précisé précédemment, et ne constitue pas l'objet de cette thèse. En revanche, plusieurs hypothèses explicatives qui ont été suggérées dans ce travail méritent que l'on détaille le plan de recherche envisagé.

Effet du complément sur les variations de poids et de masse grasse

Une nouvelle expérimentation devra être conduite afin d'expliquer l'effet de la complémentation sur la perte de poids, caractérisée par une perte de masse grasse. Afin d'éviter les écueils méthodologiques qui ont potentiellement causé un biais dans nos expérimentations, la dépense énergétique et l'efficacité apparente d'absorption énergétique (EAAE) seront mesurés pendant une période durant laquelle les souris affichent un gain de masse par unité de temps différent entre les groupes HF et HF-T63, en condition d'apports isoénergétiques. C'est-à-dire une période où le complément est effectivement actif sur la balance énergétique. Suite aux données obtenues au cours de cette thèse, la période se situerait, pour des souris HF, après 4 à 5 semaines d'exposition au régime. Une marge de sécurité est nécessaire mais il conviendra d'éviter que les animaux des deux groupes aient une différence de masse corporelle importante, comme on le remarque à partir de 8 à 9 semaines d'expérimentation. En effet, celle-ci biaise la mesure en occasionnant une dépense énergétique accrue due au coût locomoteur augmenté par la charge corporelle.

Si une dépense énergétique supérieure est mise en évidence grâce à la complémentation avec Totum-63, nous explorerons alors les voies de la thermogénèse dans les tissus concernés. Certains végétaux ont déjà prouvé leur potentiel thermogénique dans des études sérieuses (McCarty, M. F. *et al.* 2015; Stohs, S. J. et Badmaev, V. 2016) et certaines voies de signalisation de la thermogénèse sont connues, nous fournissant ainsi des hypothèses de travail. Notre attention sera ainsi premièrement dirigée vers les marqueurs de « beiging » du tissu adipeux blanc à travers l'expression de gènes tels que UCP-1, AdipoQ, CideA, Tmem 26, Prdm16, Tbx1 ou Cd137 ou le dosage de l'une des principales protéines impliquées dans le découplage mitochondrial du tissu adipeux, UCP-1 (Stanford, K. I. *et al.* 2015). Ce mécanisme, déjà décrit en paragraphe § 8.3.6, est principalement présent dans le tissu adipeux inguinal chez la souris. L'insulino-sensibilité a été améliorée par Totum-63 dans ce tissu, renforçant l'intérêt de poursuivre les investigations mécanistiques dessus. De plus, le « beiging » du tissu adipeux a aussi été décrit chez l'être humain et est considéré comme une stratégie prometteuse dans le cadre de la lutte contre l'obésité (Thyagarajan, B. et Foster Michelle, T. 2017). Un autre mécanisme de la thermogénèse est l'activation du découplage mitochondrial dans le muscle ou le tissu adipeux brun, qui pourra être estimé par dosage de la principale protéine de découplage mitochondrial

présente dans le muscle (UCP3) ou dans le tissu adipeux brun (UCP1) (Solanes, G. et al. 1997). Pour les tissus adipeux (brun et beige), reconnus aujourd'hui comme jouant un rôle majeur dans la thermogénèse (Sidossis, L. et Kajimura, S. 2015; Kiefer, F. W. 2017), la méthode de référence pour estimer leur activité est la tomographie par émission de positrons (PET-scan) couplée à l'injection d'un traceur radioactif, le fluorodesoxyglucose (^{18}F -FDG : un sucre marqué au fluor 18) (Sampath, S. C. *et al.* 2016). Cette expérimentation, réalisée *in vivo*, permet d'observer et de quantifier la captation de glucose par les organes sous la stimulation ou non d'un stimulus (exposition au froid, ...), et donc de montrer l'éventuelle activation de ces tissus lors d'une supplémentation avec un produit thermogénique. Cette technique reste néanmoins coûteuse et difficilement applicable dans le cas du muscle qui est réparti de manière homogène sur l'ensemble du corps. Il est également possible, dans l'ensemble des tissus impliqués dans la production de chaleur par découplage mitochondrial, de mesurer celui-ci grâce à une expérimentation de respiration *ex vivo* sur fibres perméabilisées, en présence de substrats énergétiques mais sans ADP (*leak state*, ou *state 4*).

Si une diminution de l'EAAE est mise en évidence, l'étape suivante consistera en une caractérisation de l'énergie restante dans les fèces en termes de macronutriments, ce qui peut fournir des pistes de travail pour la recherche d'explications possibles via l'inhibition d'enzymes digestives spécifiques à un macronutriment et/ou via une modification du microbiote intestinal.

Part de la responsabilité de la perte de masse grasse dans l'effet sur l'insulino-sensibilité

Afin de déterminer si Totum-63 agit sur la sensibilité à l'insuline avec un mécanisme additionnel à la perte de masse grasse, de prochaines expérimentations utilisant un groupe de souris HF en restriction calorique de manière à matcher le poids corporel du groupe HF-T63 pourront par exemple être conduites. Ce type d'expérimentation a déjà été réalisé par d'autres équipes sur modèle murin afin de comparer les effets d'une perte de poids liée à l'activité physique ou à une restriction calorique (Huffman, D. M. et al. 2008). L'objectif sera de comparer la réponse aux tests systémiques de tolérance au glucose, tels qu'ils avaient été conduits dans cette thèse (mesures répétées de glycémie et d'insulinémie suite à un OGTT). Si une différence est mise en évidence, l'étude de la voie de l'insuline dans les différents tissus pourra être réalisée en western-blot.

Exploration du potentiel anti-inflammatoire et antioxydant de Totum-63

Comme évoqué plus tôt dans ce manuscrit, certains végétaux entrant dans la composition de complément Totum-63 ont montré un effet anti-inflammatoire et/ou antioxydant dans des études conduites par d'autres équipes (cf. Figure 14, paragraphe §4.4.7). L'implication de l'inflammation et du stress oxydant a été établie en introduction de ce manuscrit, ce qui en fait un mécanisme potentiel des bénéfices observés sur la sensibilité à l'insuline.

En ce qui concerne les facteurs inflammatoires, un dosage plasmatique pourrait être envisagé afin de mesurer un éventuel effet systémique de Totum-63. Certaines cytokines pro-inflammatoires traditionnellement reconnues pour être impliquées dans le physiopathologie du DT2 peuvent être dosées dans le plasma, en particulier IL-6 et la protéine réactive C (Wang, X. *et al.* 2013). Dans les tissus, d'autres marqueurs pro-inflammatoires associés au DT2, tels que TNF- α , IL-1 β ou MCP-1 peuvent être dosés (Patsouris, D. *et al.* 2014). Ces cytokines ont été impliquées dans le développement de la résistance à l'insuline dans les tissus principalement concernés tels que le muscle squelettique, le foie ou le tissu adipeux.

Pour l'évaluation du stress oxydant, la mesure est délicate car l'élévation des ERO reste un phénomène transitoire et les sources d'ERO sont multiples au sein des différents types cellulaires. Il faut privilégier des mesures de paramètres multiples et complémentaires afin de les lier entre elles pour interpréter les éventuels changements observés. Trois mesures peuvent ainsi par exemple être réalisées et interprétées ensemble :

1/ Un dosage direct de la production d'ERO, par exemple en fluorimétrie couplée à de la respiration mitochondriale sur tissu perméabilisé, *ex vivo*. Cette méthode permet une mesure dynamique du flux d'une ERO tels que O_2^- ou *OH en présence de SOD qui catalyse leur transformation en H_2O_2 , lequel est détecté après réaction avec de la HRP (Horseradish Peroxidase) et de l'Amplex Red® (Mishin, V. *et al.* 2010).

2/ Une mesure du dommage causé par les ERO aux biomolécules, telles que les peroxydations lipidiques (ou des produits finaux de la réaction tels la malondialdéhyde (MDA) ou le 4-hydroxynonanal (HNE)) ou bien l'oxydation de protéines, de l'ADN ou de l'ARN (Wang, W.-X. *et al.* 2015). Cette approche, bien qu'indirecte, présente l'avantage de mesurer des marqueurs qui sont pour la plupart très stables, ce qui en fait une méthode fiable.

3/ Une détection du niveau des enzymes antioxydantes circulantes ou dans les tissus, telles que SOD, CAT ou GPx (Vijayakumar, R. S. et Nalini, N. 2006), qui contrebalancent le stress oxydant généré dans la cellule.

Enfin, au sein des tissus, certaines voies métaboliques se situent au carrefour des différents stress cellulaires que représentent l'inflammation et les réactifs oxygénés, telles que les voies IKK β /NF- κ B et JNK. Elles sont par ailleurs connues pour avoir une action inhibitrice sur la voie de l'insuline (cf. paragraphe §4.1.5.4). Leur étude pourrait ainsi fournir des pistes mécanistiques supplémentaires pour expliquer le meilleur contrôle glycémique.

Effet sur la préservation de la capacité sécrétoire du pancréas

L'effet protecteur de Totum-63 sur la fonction pancréatique peut s'expliquer soit par une préservation du volume de cellules- β ou de la conservation de la fonction sécrétoire. On peut ainsi envisager une estimation de la quantité d'îlots de Langerhans et du volume de cellules β (Noorafshan, A. et al. 2012) et une investigation des mécanismes présentés en introduction de ce manuscrit comme responsables de la dysfonction pancréatique (cf. paragraphe §4.1.4.2), particulièrement ceux liés à la glucolipotoxicité. En effet, la préservation de la capacité à sécréter de l'insuline avait été obtenue chez la souris db/db dans un contexte de diminution de l'hyperglycémie, ce qui peut ainsi constituer une hypothèse de départ.

Perspectives communes aux deux études

La jeune souris db/db constituait un modèle commun aux deux études. De manière intéressante, l'activité physique (HIIT) et la supplémentation avec Totum-63 ont toutes les deux entraîné une baisse de l'hyperglycémie sur ce modèle, mais avec des mécanismes qui semblent différents. Le HIIT a permis une meilleure activation de la voie de l'insuline (phosphorylation d'Akt suite à une injection intrapéritonéale d'insuline exogène) dans un muscle à la typologie mixte, le gastrocnémien. Sur ce même tissu, aucun effet n'était visible dans notre étude sur Totum-63, que ce soit sur le modèle de souris db/db ou chez la souris HF. Sur le modèle HF, l'effet de Totum-63 sur la sensibilité à l'insuline semblait plutôt impliquer le tissu adipeux sous-cutané. D'autre part, le complément nutritionnel a engendré une baisse marquée sur la prise de masse grasse qui n'était pas retrouvée suite à l'entraînement, quel que soit le mode (MICT ou HIIT). Ainsi, la combinaison des deux interventions pourrait présenter un bénéfice double caractérisé par une levée de l'inhibition sur le signal de l'insuline dans le muscle squelettique (effet de l'activité physique) et un effet bénéfique sur l'évolution de masse grasse et sur le signal de l'insuline du tissu adipeux sous-cutané (effet Totum-63). L'association de ces deux interventions présente donc un potentiel intéressant car complémentaire, qui devra être testé en comparaison avec la supplémentation seule et chacun des modes d'entraînement.

Plusieurs études ont déjà testé l'interaction entre activité physique et stratégies nutritionnelles. La plupart portaient sur l'effet de la modulation de la part de chaque macronutriment au cours des repas (riches en glucides, riches en protéines etc.), mais certaines se sont intéressées à l'effet d'une supplémentation avec des composés ou des extraits végétaux aux propriétés antioxydantes. Il reste toutefois difficile d'établir une conclusion définitive. En effet, alors que certains auteurs avancent que la supplémentation avec ces végétaux permet une meilleure récupération musculaire et un maintien prolongé de l'intensité (Bucci, L. R. 2000; Williams, M. 2006; Chen, C. K. et al. 2012), d'autres montrent qu'elle pourrait altérer les adaptations consécutives à l'entraînement, telles que la biogenèse mitochondriale (Strobel, N. A. et al. 2011; Abadi, A. et al. 2013; Meier, P. et al. 2013). Dans une revue récente, Merry et Ristow concluent que les effets de la prise d'antioxydants sur les adaptations à l'exercice pourraient être bénéfiques ou délétères selon le type et l'intensité des exercices pratiqués (l'activité à haute intensité étant plus dépendante de la signalisation des ERO que l'activité modérée) et de la dose d'antioxydants utilisée, une dose élevée semblant être néfaste (Merry, T. L. et Ristow, M. 2016). Certaines molécules anti-inflammatoires courantes (anti-inflammatoires non stéroïdiens) ont également fait l'objet d'études et pourraient elles aussi, à haute dose, inhiber une partie des adaptations musculaires à l'entraînement (Markworth, J. F. et al. 2014; Lilja, M. et al. 2017). Ces conclusions doivent toutefois être prises avec précautions dans le cadre de la prise en charge de patients prédiabétiques, qui présentent un état de stress oxydant relativement élevé et une

inflammation chronique de bas grade. Ces états caractéristiques du DT2 constituent une situation différente des études citées, toutes réalisées chez le sujet sain. En revanche, chez les sujets diabétiques, l'interaction entre l'activité physique et la principale molécule préconisée en traitement de première intention (*i.e.* la metformine) avait été présentée en introduction de ce manuscrit (cf. paragraphe §4.3.3). Bien que ces deux thérapies offrent séparément des bénéfices similaires, leur association s'avère généralement contre-productive. Le mécanisme d'action assez particulier de la metformine (inhibition d'un complexe de la chaîne respiratoire dans la mitochondrie) est peut-être directement en cause ici et ne présage pas d'un effet similaire avec tous les composés qui permettent d'augmenter la sensibilité à l'insuline. Enfin, rappelons que le timing de la prise du médicament et le type d'activité physique pourraient jouer un rôle important (Boulé, N. G. 2016).

Ainsi, la perspective finale de ce travail consiste en une étude des effets de l'activité physique combinée avec la supplémentation avec Totum-63. Dans l'optique d'une application au sujet prédiabétique, la supplémentation doit en effet pouvoir s'inscrire dans le cadre des recommandations sur le mode de vie conseillées par les sociétés savantes. Les effets observés sur des modèles précliniques au cours des expérimentations de cette thèse laissent supposer une possible complémentarité des bénéfices, mais l'étude de la littérature existante sur le sujet nous rappelle que certaines variables expérimentales telles que la dose de supplément, le timing ou l'intensité et la durée de l'entraînement peuvent interagir entre elles et doivent par conséquent être maniées en connaissance de cause. Les données recueillies au cours de ces nouvelles études combinant ces deux approches hygiéno-diététiques constitueront autant de nouvelles connaissances pour améliorer la prise en charge de la population prédiabétique. A terme, nous espérons permettre l'évolution des recommandations thérapeutiques pour proposer la prise en charge la plus adaptée à ces patients prédiabétiques et tendre peut-être un jour, pourquoi pas, vers un monde zéro diabète.

10. REFERENCES

1. A.D.A. (2004). "Physical Activity/Exercise and Diabetes." Diabetes Care **27**(suppl 1): s58-s62.
2. A.D.A. (2005). "Diagnosis and classification of diabetes mellitus." Diabetes Care **28** **Suppl 1**: S37-42.
3. A.D.A. (2016). "4. Prevention or Delay of Type 2 Diabetes." Diabetes Care **39**(Supplement 1): S36-S38.
4. A.D.A. (2016). "6. Obesity Management for the Treatment of Type 2 Diabetes." Diabetes Care **39**(Supplement 1): S47-S51.
5. A.D.A. (2016). "7. Approaches to Glycemic Treatment." Diabetes Care **39**(Supplement 1): S52-S59.
6. A.D.A. (2017). "2. Classification and Diagnosis of Diabetes." Diabetes Care **40**(Suppl 1): S11-S24.
7. A.D.A./A.C.S.M. (1997). "Diabetes Mellitus and Exercise." Medicine & Science in Sports & Exercise **29**(12): 1-6.
8. Abadi, A., J. D. Crane, D. Ogborn, B. Hettinga, M. Akhtar, A. Stokl, L. MacNeil, A. Safdar and M. Tarnopolsky (2013). "Supplementation with α -Lipoic Acid, CoQ10, and Vitamin E Augments Running Performance and Mitochondrial Function in Female Mice." PLoS One **8**(4): e60722.
9. Abdul-Ghani, M. A. and R. A. DeFronzo (2008). "Inhibition of renal glucose reabsorption: a novel strategy for achieving glucose control in type 2 diabetes mellitus." Endocr Pract **14**(6): 782-790.
10. Abdul-Ghani, M. A., D. Tripathy and R. A. DeFronzo (2006). "Contributions of beta-cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose." Diabetes Care **29**(5): 1130-1139.
11. Aberomand, M., S. Naghoosi and E. Basiryani (2013). "Effect of cynara scolymus on fasting blood sugar of rat." International Journal of Pharmacy and Industrial Research **03**(02): 180-182.
12. Adisakwattana, S., T. Ruengsamran, P. Kampa and W. Sompong (2012). "In vitro inhibitory effects of plant-based foods and their combinations on intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase." BMC Complementary and Alternative Medicine **12**: 110-110.
13. Afif, B. A. and P. G. Bradford (2009). Adipose Tissue and Inflammation, CRC Press
14. AFSSAPS (2011). "Suspension de l'utilisation des médicaments contenant de la pioglitazone (Actos[®], Competact[®])".
15. Aguirre, V., T. Uchida, L. Yenush, R. Davis and M. F. White (2000). "The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307)." J Biol Chem **275**(12): 9047-9054.
16. Ahlqvist, E., T. S. Ahluwalia and L. Groop (2011). "Genetics of Type 2 Diabetes." Clinical Chemistry **57**(2): 241-254.
17. Ahmadi, M., H. Madani and P. Mahzoni (2008). "Hypoglycemic and hypolipidemic effect of hydro-alcoholic of Cynara scolymus L. extract in alloxan monohydrate-induced diabetes rats to compare with glibenclamide." Iran J Med Aromat Plants(40): 148-161.
18. Al-Azzawie, H. F. and M. S. Alhamdani (2006). "Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits." Life Sci **78**(12): 1371-1377.
19. ANSES (2016). "Actualisation des repères du PNNS - Révisions des repères relatifs à l'activité physique et à la sédentarité." Avis de l'ANSES.
20. ANSES (2016). "Table de composition nutritionnelle des aliments Ciqual."
21. Armstrong, M. J., J. M. Hazlehurst, D. Hull, K. Guo, S. Borrow, J. Yu, S. C. Gough, P. N. Newsome and J. W. Tomlinson (2014). "Abdominal subcutaneous adipose tissue insulin resistance and lipolysis in patients with non-alcoholic steatohepatitis." Diabetes Obes Metab **16**(7): 651-660.
22. Atal, S., R. P. Agrawal, S. Vyas, P. Phadnis and N. Rai (2012). "Evaluation of the effect of piperine per se on blood glucose level in alloxan-induced diabetic mice." Acta Pol Pharm **69**(5): 965-969.
23. Avery, L., D. Flynn, A. van Wersch, F. F. Sniehotta and M. I. Trenell (2012). "Changing physical activity behavior in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of behavioral interventions." Diabetes Care **35**(12): 2681-2689.
24. Bailey, C. J., C. Day and B. A. Leatherdale (1986). "Traditional plant remedies for diabetes." Diabet Med **3**(2): 185-186.

25. Bao, S. and W. T. Garvey (1997). "Exercise in transgenic mice overexpressing GLUT4 glucose transporters: effects on substrate metabolism and glycogen regulation." Metabolism **46**(11): 1349-1357.
26. Barnett, A. (2006). "DPP-4 inhibitors and their potential role in the management of type 2 diabetes." International Journal of Clinical Practice **60**(11): 1454-1470.
27. Baron, A. D., L. Schaeffer, P. Shragg and O. G. Kolterman (1987). "Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics." Diabetes **36**(3): 274-283.
28. Basu, A., M. Du, M. J. Leyva, K. Sanchez, N. M. Betts, M. Wu, C. E. Aston and T. J. Lyons (2010). "Blueberries decrease cardiovascular risk factors in obese men and women with metabolic syndrome." J Nutr **140**(9): 1582-1587.
29. Baumann, C. A., V. Ribon, M. Kanzaki, D. C. Thurmond, S. Mora, S. Shigematsu, P. E. Bickel, J. E. Pessin and A. R. Saltiel (2000). "CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport." Nature **407**(6801): 202-207.
30. Bays, H., L. Mandarino and R. A. DeFronzo (2004). "Role of the Adipocyte, Free Fatty Acids, and Ectopic Fat in Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus: Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor Agonists Provide a Rational Therapeutic Approach." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **89**(2): 463-478.
31. Bays, H. E., J. M. Gonzalez-Campoy, G. A. Bray, A. E. Kitabchi, D. A. Bergman, A. B. Schorr, H. W. Rodbard and R. R. Henry (2008). "Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity." Expert Rev Cardiovasc Ther **6**(3): 343-368.
32. Bell, L. N., J. Wang, S. Muralidharan, S. Chalasani, A. M. Fullenkamp, L. A. Wilson, A. J. Sanyal, K. V. Kowdley, B. A. Neuschwander-Tetri, E. M. Brunt, A. J. McCullough, N. M. Bass, A. M. Diehl, A. Unalp-Arida and N. Chalasani (2012). "Relationship between adipose tissue insulin resistance and liver histology in nonalcoholic steatohepatitis: a pioglitazone versus vitamin E versus placebo for the treatment of nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis trial follow-up study." Hepatology **56**(4): 1311-1318.
33. Ben Salem, M., H. Affes, K. Ksouda, R. Dhouibi, Z. Sahnoun, S. Hammami and K. M. Zeghal (2015). "Pharmacological Studies of Artichoke Leaf Extract and Their Health Benefits." Plant Foods for Human Nutrition **70**(4): 441-453.
34. Ben Salem, M., R. Ben Abdallah Kolsi, R. Dhouibi, K. Ksouda, S. Charfi, M. Yaich, S. Hammami, Z. Sahnoun, K. M. Zeghal, K. Jamoussi and H. Affes (2017). "Protective effects of Cynara scolymus leaves extract on metabolic disorders and oxidative stress in alloxan-diabetic rats." BMC Complementary and Alternative Medicine **17**(1): 328.
35. Bennett, W. L., N. M. Maruthur, S. Singh, J. B. Segal, L. M. Wilson, R. Chatterjee, S. S. Marinopoulos, M. A. Puhon, P. Ranasinghe, L. Block, W. K. Nicholson, S. Hutfless, E. B. Bass and S. Bolen (2011). "Comparative effectiveness and safety of medications for type 2 diabetes: an update including new drugs and 2-drug combinations." Ann Intern Med **154**(9): 602-613.
36. Betz, M. J. and S. Enerbäck (2017). "Targeting thermogenesis in brown fat and muscle to treat obesity and metabolic disease." Nature Reviews Endocrinology **14**: 77.
37. Biddle, S. J. and A. M. Batterham (2015). "High-intensity interval exercise training for public health: a big HIT or shall we HIT it on the head?" Int J Behav Nutr Phys Act **12**: 95.
38. Bischoff, H. (1995). "The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes." Clin Invest Med **18**(4): 303-311.
39. Bischoff, S. C., G. Barbara, W. Buurman, T. Ockhuizen, J. D. Schulzke, M. Serino, H. Tilg, A. Watson and J. M. Wells (2014). "Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy." BMC Gastroenterol **14**: 189.
40. Blickle, J. F. (2006). "Meglitinide analogues: a review of clinical data focused on recent trials." Diabetes Metab **32**(2): 113-120.

41. Boquist, L., B. Hellman, A. Lernmark and I. B. Taljedal (1974). "Influence of the mutation "diabetes" on insulin release and islet morphology in mice of different genetic backgrounds." J Cell Biol **62**(1): 77-89.
42. Boulé, N. G. (2016). "Exercise Plus Metformin in the Fight Against Diabetes." Exercise and Sport Sciences Reviews **44**(1): 2.
43. Boulé, N. G., E. Haddad, G. P. Kenny, G. A. Wells and R. J. Sigal (2001). "Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of controlled clinical trials." JAMA **286**(10): 1218-1227.
44. Boushel, R., E. Gnaiger, P. Schjerling, M. Skovbro, R. Kraunsoe and F. Dela (2007). "Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle." Diabetologia **50**(4): 790-796.
45. Boyle, J. P., M. M. Engelgau, T. J. Thompson, M. G. Goldschmid, G. L. Beckles, D. S. Timberlake, W. H. Herman, D. C. Ziemer and D. L. Gallina (1999). "Estimating prevalence of type 1 and type 2 diabetes in a population of African Americans with diabetes mellitus." Am J Epidemiol **149**(1): 55-63.
46. Broderick, T. L., C. R. Parrott, D. Wang, M. Jankowski and J. Gutkowska (2012). "Expression of cardiac GATA4 and downstream genes after exercise training in the db/db mouse." Pathophysiology **19**(3): 193-203.
47. Brozinick, J. T., S. C. McCoid, T. H. Reynolds, N. A. Nardone, D. M. Hargrove, R. W. Stevenson, S. W. Cushman and E. M. Gibbs (2001). "GLUT4 Overexpression in db/db Mice Dose-Dependently Ameliorates Diabetes But Is Not a Lifelong Cure." Diabetes **50**(3): 593-600.
48. Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales.
49. Bruno, G., C. Runzo, P. Cavallo-Perin, F. Merletti, M. Rivetti, S. Pinach, G. Novelli, M. Trovati, F. Cerutti and G. Pagano (2005). "Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults aged 30-49 years: the population-based registry in the province of Turin, Italy." Diabetes Care **28**(11): 2613-2619.
50. Bryant, N. J., R. Govers and D. E. James (2002). "Regulated transport of the glucose transporter GLUT4." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(4): 267-277.
51. Bucci, L. R. (2000). "Selected herbals and human exercise performance." Am J Clin Nutr **72**(2 Suppl): 624S-636S.
52. Buchheit, M. and P. B. Laursen (2013). "High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle. Part II: anaerobic energy, neuromuscular load and practical applications." Sports Med **43**(10): 927-954.
53. Butler, A. E., J. Janson, S. Bonner-Weir, R. Ritzel, R. A. Rizza and P. C. Butler (2003). "Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes." Diabetes **52**(1): 102-110.
54. Cacho, J., J. Sevillano, J. de Castro, E. Herrera and M. P. Ramos (2008). "Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats." American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism **295**(5): E1269-E1276.
55. Cani, P. D., J. Amar, M. A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, A. M. Neyrinck, F. Fava, K. M. Tuohy, C. Chabo, A. Waget, E. Delmée, B. Cousin, T. Sulpice, B. Chamontin, J. Ferrières, J.-F. Tanti, G. R. Gibson, L. Casteilla, N. M. Delzenne, M. C. Alessi and R. Burcelin (2007). "Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance." Diabetes **56**(7): 1761-1772.
56. Canter, P. H. and E. Ernst (2004). "Anthocyanosides of *Vaccinium myrtillus* (bilberry) for night vision--a systematic review of placebo-controlled trials." Surv Ophthalmol **49**(1): 38-50.
57. Cao, L., Eugene Y. Choi, X. Liu, A. Martin, C. Wang, X. Xu and Matthew J. During (2011). "White to Brown Fat Phenotypic Switch Induced by Genetic and Environmental Activation of a Hypothalamic-Adipocyte Axis." Cell Metabolism **14**(3): 324-338.
58. Capeau, J. (2003). "[Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]." Med Sci (Paris) **19**(8-9): 834-839.
59. Carabott, S. (2016). Race to save endemic olive tree intensifies. Times of Malta.
60. Cassidy, S., C. Thoma, K. Hallsworth, J. Parikh, K. G. Hollingsworth, R. Taylor, D. G. Jakovljevic and M. I. Trenell (2016). "High intensity intermittent exercise improves cardiac structure and

- function and reduces liver fat in patients with type 2 diabetes: a randomised controlled trial." Diabetologia **59**(1): 56-66.
61. Cassidy, S., C. Thoma, D. Houghton and M. I. Trenell (2017). "High-intensity interval training: a review of its impact on glucose control and cardiometabolic health." Diabetologia **60**(1): 7-23.
 62. Ceddia, R. B., H. A. Koistinen, J. R. Zierath and G. Sweeney (2002). "Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance." FASEB J **16**(10): 1163-1176.
 63. Chawla, A., R. Chawla and S. Jaggi (2016). "Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum?" Indian Journal of Endocrinology and Metabolism **20**(4): 546-551.
 64. Chen, C. K., A. S. Muhamad and F. K. Ooi (2012). "Herbs in exercise and sports." Journal of Physiological Anthropology **31**(1): 4-4.
 65. Chen, Y., F. A. Sloan and A. P. Yashkin (2015). "Adherence to diabetes guidelines for screening, physical activity and medication and onset of complications and death." J Diabetes Complications **29**(8): 1228-1233.
 66. Chiang, S. H., C. A. Baumann, M. Kanzaki, D. C. Thurmond, R. T. Watson, C. L. Neudauer, I. G. Macara, J. E. Pessin and A. R. Saltiel (2001). "Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10." Nature **410**(6831): 944-948.
 67. Chiang, S. H., L. Chang and A. R. Saltiel (2006). "TC10 and insulin-stimulated glucose transport." Methods Enzymol **406**: 701-714.
 68. Choi, S., Y. Choi, S. Kim, J. Jang and T. Park (2013). "Piperine reverses high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance in mice." Food Chem **141**(4): 3627-3635.
 69. Choukem, S. P. and J. F. Gautier (2008). "How to measure hepatic insulin resistance?" Diabetes & Metabolism **34**(6, Part 2): 664-673.
 70. Chu, W. K., C. M. Sabrina, M. Cheung, A. Roxanna, W. Lau and I. F. F. Benzie (2011). Bilberry (Vaccinium myrtillus L.). Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition. W.-G. S. Benzie IFF, Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis.
 71. Cignarella, A., M. Nastasi, E. Cavalli and L. Puglisi (1996). "Novel lipid-lowering properties of Vaccinium myrtillus L. leaves, a traditional antidiabetic treatment, in several models of rat dyslipidaemia: a comparison with ciprofibrate." Thromb Res **84**(5): 311-322.
 72. CNAMTS (2012). "Propositions de l'assurance maladie sur les charges et produits pour l'année 2013."
 73. Cnop, M., F. Foufelle and L. A. Velloso "Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes." Trends in Molecular Medicine **18**(1): 59-68.
 74. Cochran, A. J., M. E. Percival, S. Tricarico, J. P. Little, N. Cermak, J. B. Gillen, M. A. Tarnopolsky and M. J. Gibala (2014). "Intermittent and continuous high-intensity exercise training induce similar acute but different chronic muscle adaptations." Exp Physiol **99**(5): 782-791.
 75. Colberg, S. R., R. J. Sigal, B. Fernhall, J. G. Regensteiner, B. J. Blissmer, R. R. Rubin, L. Chasan-Taber, A. L. Albright and B. Braun (2010). "Exercise and type 2 diabetes: the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement." Diabetes Care **33**(12): e147-167.
 76. Colberg, S. R., R. J. Sigal, J. E. Yardley, M. C. Riddell, D. W. Dunstan, P. C. Dempsey, E. S. Horton, K. Castorino and D. F. Tate (2016). "Physical Activity/Exercise and Diabetes: A Position Statement of the American Diabetes Association." Diabetes Care **39**(11): 2065-2079.
 77. Coleman, D. L. (1978). "Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice." Diabetologia **14**(3): 141-148.
 78. Craig, T. J., F. M. Ashcroft and P. Proks (2008). "How ATP Inhibits the Open K⁺ Channel." The Journal of General Physiology **132**(1): 131.
 79. Crescenzo, R., F. Bianco, A. Mazzoli, A. Giacco, G. Liverini and S. Iossa (2016). "A possible link between hepatic mitochondrial dysfunction and diet-induced insulin resistance." European Journal of Nutrition **55**(1): 1-6.

80. Cunha, V. N., M. de Paula Lima, D. Motta-Santos, J. L. Pesquero, R. V. de Andrade, J. A. de Almeida, R. C. Araujo, C. S. Grubert Campbell, J. E. Lewis and H. G. Simões (2015). "Role of exercise intensity on GLUT4 content, aerobic fitness and fasting plasma glucose in type 2 diabetic mice." Cell Biochemistry and Function **33**(7): 435-442.
81. Cusi, K. (2010). "The Role of Adipose Tissue and Lipotoxicity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes." Current Diabetes Reports **10**(4): 306-315.
82. Dardevet, D., C. Sornet, M. Balage and J. Grizard (2000). "Stimulation of in vitro rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age." J Nutr **130**(11): 2630-2635.
83. Dawid, C., A. Henze, O. Frank, A. Glabasnia, M. Rupp, K. Büning, D. Orlikowski, M. Bader and T. Hofmann (2012). "Structural and Sensory Characterization of Key Pungent and Tingling Compounds from Black Pepper (*Piper nigrum* L.)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **60**(11): 2884-2895.
84. de Luca, C. and J. M. Olefsky (2008). "Inflammation and insulin resistance." FEBS Lett **582**(1): 97-105.
85. De Rosso, V. V., F. E. Moran Vieyra, A. Z. Mercadante and C. D. Borsarelli (2008). "Singlet oxygen quenching by anthocyanin's flavylum cations." Free Radic Res **42**(10): 885-891.
86. de Wilde, J., R. Mohren, S. van den Berg, M. Boekschoten, K. W. Dijk, P. de Groot, M. Muller, E. Mariman and E. Smit (2008). "Short-term high fat-feeding results in morphological and metabolic adaptations in the skeletal muscle of C57BL/6J mice." Physiol Genomics **32**(3): 360-369.
87. DeFronzo, R. A. (2009). "Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus." Diabetes **58**(4): 773-795.
88. DeFuria, J., G. Bennett, K. J. Strissel, J. W. Perfield, 2nd, P. E. Milbury, A. S. Greenberg and M. S. Obin (2009). "Dietary blueberry attenuates whole-body insulin resistance in high fat-fed mice by reducing adipocyte death and its inflammatory sequelae." J Nutr **139**(8): 1510-1516.
89. Denou, E., K. Marcinko, M. G. Surette, G. R. Steinberg and J. D. Schertzer (2016). "High-intensity exercise training increases the diversity and metabolic capacity of the mouse distal gut microbiota during diet-induced obesity." American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism **310**(11): E982-E993.
90. Denou, E., K. Marcinko, M. G. Surette, G. R. Steinberg and J. D. Schertzer (2016). "High-intensity exercise training increases the diversity and metabolic capacity of the mouse distal gut microbiota during diet-induced obesity." Am J Physiol Endocrinol Metab **310**(11): E982-993.
91. Derosa, G., P. Maffioli and A. Sahebkar (2016). Piperine and Its Role in Chronic Diseases. Anti-inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases. S. C. Gupta, S. Prasad and B. B. Aggarwal. Cham, Springer International Publishing: 173-184.
92. Despres, J. P., A. Nadeau, A. Tremblay, M. Ferland, S. Moorjani, P. J. Lupien, G. Theriault, S. Pinault and C. Bouchard (1989). "Role of deep abdominal fat in the association between regional adipose tissue distribution and glucose tolerance in obese women." Diabetes **38**(3): 304-309.
93. Desvergne, B. and W. Wahli (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism." Endocr Rev **20**(5): 649-688.
94. Di Meo, S., S. Iossa and P. Venditti (2017). "Skeletal muscle insulin resistance: role of mitochondria and other ROS sources." J Endocrinol **233**(1): R15-R42.
95. Diabetes.co.uk. (2015). "SGLT2 Inhibitors (Gliflozins)." Retrieved 10/07, 2017, from <http://www.diabetes.co.uk/diabetes-medication/sgl2-inhibitors.html>.
96. Diwan, V., H. Poudyal and L. Brown (2013). "Piperine attenuates cardiovascular, liver and metabolic changes in high carbohydrate, high fat-fed rats." Cell Biochem Biophys **67**(2): 297-304.
97. Donath, M. Y., J. A. Ehses, K. Maedler, D. M. Schumann, H. Ellingsgaard, E. Eppler and M. Reinecke (2005). "Mechanisms of β -Cell Death in Type 2 Diabetes." Diabetes **54**(suppl 2): S108-S113.
98. Dong, M., D. Yu, N. Abdullah Al-Dhabi and V. Duraipandiyani (2017). "The Impacts of *Chrysanthemum indicum* Extract on Oxidative Stress and Inflammatory Responses in Adjuvant-Induced Arthritic Rats." Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine **2017**: 7.
99. Drucker, D. J. (2006). "The biology of incretin hormones." Cell Metab **3**(3): 153-165.

100. Du, H., J. Shao, P. Gu, B. Lu, X. Ye and Z. Liu (2012). "Improvement of glucose tolerance by rhein with restored early-phase insulin secretion in db/db mice." Journal of Endocrinological Investigation **35**(6): 607-612.
101. Duclos, M., J. M. Oppert, B. Verges, V. Coliche, J. F. Gautier, Y. Guezennec, G. Reach and G. Strauch (2013). "Physical activity and type 2 diabetes. Recommendations of the SFD (Francophone Diabetes Society) diabetes and physical activity working group." Diabetes Metab **39**(3): 205-216.
102. Dulloo, A. G., C. A. Geissler, T. Horton, A. Collins and D. S. Miller (1989). "Normal caffeine consumption: influence on thermogenesis and daily energy expenditure in lean and postobese human volunteers." The American Journal of Clinical Nutrition **49**(1): 44-50.
103. Dunham-Snary, K. J. and S. W. Ballinger (2013). "Mitochondrial genetics and obesity: evolutionary adaptation and contemporary disease susceptibility." Free Radic Biol Med **65**: 1229-1237.
104. E.C.D.C.D.M. (2003). "Follow-up Report on the Diagnosis of Diabetes Mellitus." Diabetes Care **26**(11): 3160-3167.
105. E.C.D.C.D.M. (2003). "Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus." Diabetes Care **26**(suppl 1): s5-s20.
106. Egan, B., B. P. Carson, P. M. Garcia-Roves, A. V. Chibalin, F. M. Sarsfield, N. Barron, N. McCaffrey, N. M. Moyna, J. R. Zierath and D. J. O'Gorman (2010). "Exercise intensity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 mRNA abundance is associated with differential activation of upstream signalling kinases in human skeletal muscle." J Physiol **588**(Pt 10): 1779-1790.
107. Eizirik, D. L., A. K. Cardozo and M. Cnop (2008). "The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus." Endocr Rev **29**(1): 42-61.
108. El Kamouni, S., R. El Kebbij, P. Andreoletti, A. El Ktaibi, I. Rharrassi, A. Essamadi, M. h. S. El Kebbij, S. Mandard, N. Latruffe, J. Vamecq, B. Nasser and M. Cherkaoui-Malki (2017). "Protective Effect of Argan and Olive Oils against LPS-Induced Oxidative Stress and Inflammation in Mice Livers." International Journal of Molecular Sciences **18**(10): 2181.
109. El, S. N. and S. Karakaya (2009). "Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health." Nutrition Reviews **67**(11): 632-638.
110. Elmquist, J. K., C. F. Elias and C. B. Saper (1999). "From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight." Neuron **22**(2): 221-232.
111. Eriksson, J., L. Koranyi, R. Bourey, C. Schalin-Jantti, E. Widen, M. Mueckler, A. M. Permutt and L. C. Groop (1992). "Insulin resistance in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients and their relatives is not associated with a defect in the expression of the insulin-responsive glucose transporter (GLUT-4) gene in human skeletal muscle." Diabetologia **35**(2): 143-147.
112. Erridge, C. (2011). "Diet, commensals and the intestine as sources of pathogen-associated molecular patterns in atherosclerosis, type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease." Atherosclerosis **216**(1): 1-6.
113. Evans, J. M., R. W. Newton, D. A. Ruta, T. M. MacDonald and A. D. Morris (2000). "Socio-economic status, obesity and prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes mellitus." Diabet Med **17**(6): 478-480.
114. Fabbrini, E., F. Magkos, C. Conte, B. Mittendorfer, B. W. Patterson, A. L. Okunade and S. Klein (2012). "Validation of a novel index to assess insulin resistance of adipose tissue lipolytic activity in obese subjects." J Lipid Res **53**(2): 321-324.
115. Facts_and_Comparisons (2005). Drug Facts and Comparisons, St. Louis, Mo: .
116. Fam, B. C., L. J. Rose, R. Sgambellone, Z. Ruan, J. Proietto and S. Andrikopoulos (2012). "Normal muscle glucose uptake in mice deficient in muscle GLUT4." J Endocrinol **214**(3): 313-327.
117. FDA. (2016, 12/12/2016). "Pioglitazone-containing Medicines: Drug Safety Communication - Updated FDA Review, Increased Risk of Bladder Cancer." Retrieved 18/08/2017, from <https://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm532772.htm>.

118. Ferrannini, E., A. Gastaldelli, Y. Miyazaki, M. Matsuda, A. Mari and R. A. DeFronzo (2005). "beta-Cell function in subjects spanning the range from normal glucose tolerance to overt diabetes: a new analysis." J Clin Endocrinol Metab **90**(1): 493-500.
119. Ferwana, M., B. Firwana, R. Hasan, M. H. Al-Mallah, S. Kim, V. M. Montori and M. H. Murad (2013). "Pioglitazone and risk of bladder cancer: a meta-analysis of controlled studies." Diabetic Medicine **30**(9): 1026-1032.
120. Festi, D., R. Schiumerini, L. H. Eusebi, G. Marasco, M. Taddia and A. Colecchia (2014). "Gut microbiota and metabolic syndrome." World J Gastroenterol **20**(43): 16079-16094.
121. Fex, A., J. P. Leduc-Gaudet, M. E. Fillion, A. D. Karelis and M. Aubertin-Leheudre (2015). "Effect of Elliptical High Intensity Interval Training on Metabolic Risk Factor in Pre- and Type 2 Diabetes Patients: A Pilot Study." J Phys Act Health **12**(7): 942-946.
122. Fiuza-Luces, C., N. Garatachea, N. A. Berger and A. Lucia (2013). "Exercise is the Real Polypill." Physiology **28**(5): 330-358.
123. Foretz, M. and B. Viollet (2009). "Mécanisme d'action hépatique de la metformine dans le diabète de type 2." Médecine des Maladies Métaboliques **3**(1): 48-54.
124. Foretz, M. and B. Viollet (2010). "[Mechanism of inhibition of hepatic glucose production by metformin: a new concept for an old remedy]." Med Sci (Paris) **26**(6-7): 663-666.
125. Forsmark, C. E. (2016). "Incretins, Diabetes, Pancreatitis and Pancreatic Cancer: What the GI specialist needs to know." Pancreatology **16**(1): 10-13.
126. Fournier, C., A. Chabert, H. Mosnier-Pudar, I. Aujoulat, A. Fagot-Campagna and A. Gautier (2011). "Etude ENTRED 2007-2010." INPES.
127. Francois, M. E. and J. P. Little (2015). "Effectiveness and safety of high-intensity interval training in patients with type 2 diabetes." Diabetes Spectr **28**(1): 39-44.
128. Frayn, K. N. (2001). "Adipose tissue and the insulin resistance syndrome." Proc Nutr Soc **60**(3): 375-380.
129. Fruci, B., S. Giuliano, A. Mazza, R. Malaguarnera and A. Belfiore (2013). "Nonalcoholic Fatty Liver: A Possible New Target for Type 2 Diabetes Prevention and Treatment." International Journal of Molecular Sciences **14**(11): 22933-22966.
130. Fueger, P. T., D. P. Bracy, C. M. Malabanan, R. R. Pencek and D. H. Wasserman (2004). "Distributed control of glucose uptake by working muscles of conscious mice: roles of transport and phosphorylation." Am J Physiol Endocrinol Metab **286**(1): E77-84.
131. Gaesser, G. A., S. S. Angadi and B. J. Sawyer (2011). "Exercise and diet, independent of weight loss, improve cardiometabolic risk profile in overweight and obese individuals." Phys Sportsmed **39**(2): 87-97.
132. Garcia-Roves, P., J. M. Huss, D. H. Han, C. R. Hancock, E. Iglesias-Gutierrez, M. Chen and J. O. Holloszy (2007). "Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(25): 10709-10713.
133. Gaspar, T. (1994). Chrysanthellum americanum: Micropropagation and Flavonoid Production. Medicinal and Aromatic Plants VII. Y. P. S. Bajaj. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 113-122.
134. Gastaldelli, A., M. Gaggini and R. A. DeFronzo (2017). "Role of Adipose Tissue Insulin Resistance in the Natural History of Type 2 Diabetes: Results From the San Antonio Metabolism Study." Diabetes **66**(4): 815-822.
135. Gaster, M., P. Staehr, H. Beck-Nielsen, H. D. Schroder and A. Handberg (2001). "GLUT4 is reduced in slow muscle fibers of type 2 diabetic patients: is insulin resistance in type 2 diabetes a slow, type 1 fiber disease?" Diabetes **50**(6): 1324-1329.
136. Gebhardt, R. (1997). "Inhibition of hepatic cholesterol biosynthesis by artichoke leaf extracts is mainly due to luteolin." Cell Biology and Toxicology **13**: 58-58.
137. Gebhardt, R. (1998). "Inhibition of Cholesterol Biosynthesis in Primary Cultured Rat Hepatocytes by Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Extracts." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **286**(3): 1122-1128.

138. Gibala, M. J., J. P. Little, M. J. Macdonald and J. A. Hawley (2012). "Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease." *J Physiol* **590**(5): 1077-1084.
139. Gibala, M. J., J. P. Little, M. van Essen, G. P. Wilkin, K. A. Burgomaster, A. Safdar, S. Raha and M. A. Tarnopolsky (2006). "Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance." *J Physiol* **575**(Pt 3): 901-911.
140. Gibbs, E. M., J. L. Stock, S. C. McCoid, H. A. Stukenbrok, J. E. Pessin, R. W. Stevenson, A. J. Milici and J. D. McNeish (1995). "Glycemic improvement in diabetic db/db mice by overexpression of the human insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4)." *Journal of Clinical Investigation* **95**(4): 1512-1518.
141. Gillen, J. B., J. P. Little, Z. Punthakee, M. A. Tarnopolsky, M. C. Riddell and M. J. Gibala (2012). "Acute high-intensity interval exercise reduces the postprandial glucose response and prevalence of hyperglycaemia in patients with type 2 diabetes." *Diabetes Obes Metab* **14**(6): 575-577.
142. Glass, C. K. and J. M. Olefsky (2012). "Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance." *Cell Metab* **15**(5): 635-645.
143. Godoy-Matos, A. F. (2014). "The role of glucagon on type 2 diabetes at a glance." *Diabetol Metab Syndr* **6**(1): 91.
144. Gonzalez, J. T., M. J. Barwood, S. Goodall, K. Thomas and G. Howatson (2015). "Alterations in Whole-Body Insulin Sensitivity Resulting From Repeated Eccentric Exercise of a Single Muscle Group: A Pilot Investigation." *Int J Sport Nutr Exerc Metab* **25**(4): 405-410.
145. Gonzalez, M., A. Zarzuelo, M. J. Gamez, M. P. Utrilla, J. Jimenez and I. Osuna (1992). "Hypoglycemic activity of olive leaf." *Planta medica* **58**(6): 513-515.
146. Graf, B. L., I. Raskin, W. T. Cefalu and D. M. Ribnicky (2010). "Plant-derived therapeutics for the treatment of metabolic syndrome." *Curr Opin Investig Drugs* **11**(10): 1107-1115.
147. Gregor, M. F., L. Yang, E. Fabbrini, B. S. Mohammed, J. C. Eagon, G. S. Hotamisligil and S. Klein (2009). "Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss." *Diabetes* **58**(3): 693-700.
148. Groop, L. C., R. C. Bonadonna, S. DelPrato, K. Ratheiser, K. Zyck, E. Ferrannini and R. A. DeFronzo (1989). "Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance." *J Clin Invest* **84**(1): 205-213.
149. H.A.S. (2014). "Actes et Prestations - ALD N° 8 « Diabète de type 1 et diabète de type 2 »" *Haute Autorité de Santé* **8**.
150. HAGR (2017) "AnAge entry for *Mus musculus*."
151. Hancock, C. R., D. H. Han, M. Chen, S. Terada, T. Yasuda, D. C. Wright and J. O. Holloszy (2008). "High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(22): 7815-7820.
152. HAS (2011). "Développement de la prescription de thérapeutiques non médicamenteuses validées." *SDIP/V.Combe*.
153. Haw, J., K. I. Galaviz, A. N. Straus and et al. (2017). "Long-term sustainability of diabetes prevention approaches: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials." *JAMA Internal Medicine* **177**(12): 1808-1817.
154. Hawley, J. A. and J. O. Holloszy (2009). "Exercise: it's the real thing!" *Nutr Rev* **67**(3): 172-178.
155. Heckers, H., K. Dittmar, F. W. Schmahl and K. Huth (1977). "Inefficiency of cynarin as therapeutic regimen in familial type II hyperlipoproteinaemia." *Atherosclerosis* **26**(2): 249-253.
156. Heidarian, E. and Y. Soofiniya (2011). "Hypolipidemic and hypoglycemic effects of aerial part of *Cynara scolymus* in streptozotocin-induced diabetic rats." *Journal of medicinal plant research*(52): 717 – 723.
157. Henriksen, E. J., M. K. Diamond-Stanic and E. M. Marchionne (2011). "Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes." *Free Radic Biol Med* **51**(5): 993-999.

158. Hernandez-Alvarez, M. I., H. Thabit, N. Burns, S. Shah, I. Brema, M. Hatunic, F. Finucane, M. Liesa, C. Chiellini, D. Naon, A. Zorzano and J. J. Nolan (2010). "Subjects with early-onset type 2 diabetes show defective activation of the skeletal muscle PGC-1 α /Mitofusin-2 regulatory pathway in response to physical activity." *Diabetes Care* **33**(3): 645-651.
159. Hesselink, M. K., V. Schrauwen-Hinderling and P. Schrauwen (2016). "Skeletal muscle mitochondria as a target to prevent or treat type 2 diabetes mellitus." *Nat Rev Endocrinol* **12**(11): 633-645.
160. Hirosumi, J., G. Tuncman, L. Chang, C. Z. Gorgun, K. T. Uysal, K. Maeda, M. Karin and G. S. Hotamisligil (2002). "A central role for JNK in obesity and insulin resistance." *Nature* **420**(6913): 333-336.
161. Hoeks, J. and P. Schrauwen (2012). "Muscle mitochondria and insulin resistance: a human perspective." *Trends Endocrinol Metab* **23**(9): 444-450.
162. Hoggard, N., M. Cruickshank, K.-M. Moar, C. Bestwick, J. J. Holst, W. Russell and G. Horgan (2013). "A single supplement of a standardised bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract (36 % wet weight anthocyanins) modifies glycaemic response in individuals with type 2 diabetes controlled by diet and lifestyle." *Journal of nutritional science* **2**, e22 DOI: 10.1017/jns.2013.16.
163. Holloszy, J. O. (2005). "Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity." *Journal of Applied Physiology* **99**(1): 338-343.
164. Holman, R. R., S. K. Paul, M. A. Bethel, D. R. Matthews and H. A. W. Neil (2008). "10-Year Follow-up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes." *New England Journal of Medicine* **359**(15): 1577-1589.
165. Holtkamp, H. C., N. J. Verhoef and B. Leijnse (1975). "The difference between the glucose concentrations in plasma and whole blood." *Clinica Chimica Acta* **59**(1): 41-49.
166. Hoshino, D., Y. Yoshida, Y. Kitaoka, H. Hatta and A. Bonen (2013). "High-intensity interval training increases intrinsic rates of mitochondrial fatty acid oxidation in rat red and white skeletal muscle." *Appl Physiol Nutr Metab* **38**(3): 326-333.
167. Howlett, K. F., S. Andrikopoulos, J. Proietto and M. Hargreaves (2013). "Exercise-induced muscle glucose uptake in mice with graded, muscle-specific GLUT-4 deletion." *Physiol Rep* **1**(3): e00065.
168. Huffman, D. M., D. R. Moellering, W. E. Grizzle, C. R. Stockard, M. S. Johnson and T. R. Nagy (2008). "Effect of exercise and calorie restriction on biomarkers of aging in mice." *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **294**(5): R1618-R1627.
169. IDF (2015). IDF Diabetes Atlas, 7th edn. I. D. Federation. Brussels, Belgium.
170. Ikemoto, S., K. S. Thompson, H. Itakura, M. D. Lane and O. Ezaki (1995). "Expression of an insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) minigene in transgenic mice: effect of exercise and role in glucose homeostasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(3): 865-869.
171. Ingalls, A. M., M. M. Dickie and G. D. Snell (1950). "Obese, a new mutation in the house mouse." *J Hered* **41**(12): 317-318.
172. INSERM (2008). "Activité physique : contextes et effets sur la santé. Rapport." *Les éditions Inserm*.
173. Inzucchi, S. E., R. M. Bergenstal, J. B. Buse, M. Diamant, E. Ferrannini, M. Nauck, A. L. Peters, A. Tsapas, R. Wender and D. R. Matthews (2012). "Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Patient-Centered Approach." *Position Statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD)* **35**(6): 1364-1379.
174. Inzucchi, S. E., R. M. Bergenstal, J. B. Buse, M. Diamant, E. Ferrannini, M. Nauck, A. L. Peters, A. Tsapas, R. Wender and D. R. Matthews (2015). "Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centred approach. Update to a Position Statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes." *Diabetologia* **58**(3): 429-442.
175. Inzucchi, S. E., R. M. Bergenstal, J. B. Buse, M. Diamant, E. Ferrannini, M. Nauck, A. L. Peters, A. Tsapas, R. Wender and D. R. Matthews (2015). "Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to a position statement of the American

- Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes." Diabetes Care **38**(1): 140-149.
176. Islam, M. S. and V. Venkatesan (2016). Experimentally-induced animal models of prediabetes and insulin resistance: A review.
 177. Jolleyman, C., T. Yates, G. O'Donovan, L. J. Gray, J. A. King, K. Khunti and M. J. Davies (2015). "The effects of high-intensity interval training on glucose regulation and insulin resistance: a meta-analysis." Obes Rev **16**(11): 942-961.
 178. Jeon, C. Y., R. P. Lokken, F. B. Hu and R. M. van Dam (2007). "Physical activity of moderate intensity and risk of type 2 diabetes: a systematic review." Diabetes Care **30**(3): 744-752.
 179. Jiang, C., A. T. Ting and B. Seed (1998). "PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines." Nature **391**(6662): 82-86.
 180. Jin, W. and M. E. Patti (2009). "Genetic determinants and molecular pathways in the pathogenesis of Type 2 diabetes." Clin Sci (Lond) **116**(2): 99-111.
 181. Jin, Z., G. Borjihan, R. Zhao, Z. Sun, G. B. Hammond and T. Uryu (2009). "Antihyperlipidemic compounds from the fruit of Piper longum L." Phytother Res **23**(8): 1194-1196.
 182. Jones, I. R., D. R. Owens, S. Luzio, S. Williams and T. M. Hayes (1989). "The glucose dependent insulinotropic polypeptide response to oral glucose and mixed meals is increased in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus." Diabetologia **32**(9): 668-677.
 183. Jung, M. E., J. E. Bourne, M. R. Beauchamp, E. Robinson and J. P. Little (2015). "High-intensity interval training as an efficacious alternative to moderate-intensity continuous training for adults with prediabetes." J Diabetes Res **2015**: 191595.
 184. Jung, M. E., J. E. Bourne and J. P. Little (2014). "Where does HIT fit? An examination of the affective response to high-intensity intervals in comparison to continuous moderate- and continuous vigorous-intensity exercise in the exercise intensity-affect continuum." PLoS One **9**(12): e114541.
 185. Jung, S. (2005). "Apport des drogues végétales dans la prévention des maladies cardiovasculaires liées à l'hypercholestérolémie." Thèse Faculté de Pharmacie de Nancy.
 186. Jwa, H., Y. Choi, U. H. Park, S. J. Um, S. K. Yoon and T. Park (2012). "Piperine, an LXRalpha antagonist, protects against hepatic steatosis and improves insulin signaling in mice fed a high-fat diet." Biochem Pharmacol **84**(11): 1501-1510.
 187. Karlsen, A., L. Retterstol, P. Laake, I. Paur, S. K. Bohn, L. Sandvik and R. Blomhoff (2007). "Anthocyanins inhibit nuclear factor-kappaB activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults." J Nutr **137**(8): 1951-1954.
 188. Karlsson, H. K. R., J. R. Zierath, S. Kane, A. Krook, G. E. Lienhard and H. Wallberg-Henriksson (2005). "Insulin-Stimulated Phosphorylation of the Akt Substrate AS160 Is Impaired in Skeletal Muscle of Type 2 Diabetic Subjects." Diabetes **54**(6): 1692-1697.
 189. Kato, M., T. Tani, N. Terahara and T. Tsuda (2015). "The Anthocyanin Delphinidin 3-Rutinoside Stimulates Glucagon-Like Peptide-1 Secretion in Murine GLUTag Cell Line via the Ca(2+)/Calmodulin-Dependent Kinase II Pathway." PLoS One **10**(5): e0126157.
 190. Keipert, S., M. Kutschke, M. Ost, T. Schwarzmayr, E. M. van Schothorst, D. Lamp, L. Brachthäuser, I. Hamp, S. E. Mazibuko, S. Hartwig, S. Lehr, E. Graf, O. Plettenburg, F. Neff, M. H. Tschöp and M. Jastroch (2017). "Long-Term Cold Adaptation Does Not Require FGF21 or UCP1." Cell Metabolism **26**(2): 437-446.e435.
 191. Kelley, D. E., B. H. Goodpaster and L. Storlien (2002). "Muscle triglyceride and insulin resistance." Annu Rev Nutr **22**: 325-346.
 192. Kemi, O. J., J. P. Loennechen, U. Wisloff and O. Ellingsen (2002). "Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy." J Appl Physiol (1985) **93**(4): 1301-1309.
 193. Kennedy, A. J., K. L. Ellacott, V. L. King and A. H. Hasty (2010). "Mouse models of the metabolic syndrome." Dis Model Mech **3**(3-4): 156-166.
 194. Kiefer, F. W. (2017). "The significance of beige and brown fat in humans." Endocrine Connections **6**(5): R70-R79.

195. Kim, J. K., A. Zisman, J. J. Fillmore, O. D. Peroni, K. Kotani, P. Perret, H. Zong, J. Dong, C. R. Kahn, B. B. Kahn and G. I. Shulman (2001). "Glucose toxicity and the development of diabetes in mice with muscle-specific inactivation of GLUT4." *J Clin Invest* **108**(1): 153-160.
196. Kim, O. K., W. Jun and J. Lee (2015). "Mechanism of ER Stress and Inflammation for Hepatic Insulin Resistance in Obesity." *Annals of Nutrition and Metabolism* **67**(4): 218-227.
197. King, A. C., W. L. Haskell, D. R. Young, R. K. Oka and M. L. Stefanick (1995). "Long-term effects of varying intensities and formats of physical activity on participation rates, fitness, and lipoproteins in men and women aged 50 to 65 years." *Circulation* **91**(10): 2596-2604.
198. King, A. J. F. (2012). "The use of animal models in diabetes research." *British Journal of Pharmacology* **166**(3): 877-894.
199. King, M. W. (2017, 26/03/2017). "Adipose Tissue: Not Just Fat." Retrieved 25/07/2017, 2017, from <https://themedicalbiochemistrypage.org/adipose-tissue.php>.
200. Kirpichnikov, D., S. I. McFarlane and J. R. Sowers (2002). "Metformin: An update." *Annals of Internal Medicine* **137**(1): 25-33.
201. Kirwan, J. P., J. Sacks and S. Nieuwoudt (2017). "The essential role of exercise in the management of type 2 diabetes." *Cleve Clin J Med* **84**(7 Suppl 1): S15-S21.
202. Kjems, L. L., J. J. Holst, A. Volund and S. Madsbad (2003). "The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion: effects on beta-cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects." *Diabetes* **52**(2): 380-386.
203. Knight, Z. A., K. S. Hannan, M. L. Greenberg and J. M. Friedman (2010). "Hyperleptinemia Is Required for the Development of Leptin Resistance." *PLoS One* **5**(6): e11376.
204. Knowler, W. C., E. Barrett-Connor, S. E. Fowler, R. F. Hamman, J. M. Lachin, E. A. Walker and D. M. Nathan (2002). "Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin." *N Engl J Med* **346**(6): 393-403.
205. Knowler, W. C., K. M. Narayan, R. L. Hanson, R. G. Nelson, P. H. Bennett, J. Tuomilehto, B. Schersten and D. J. Pettitt (1995). "Preventing non-insulin-dependent diabetes." *Diabetes* **44**(5): 483-488.
206. Koliaki, C. and M. Roden (2016). "Alterations of Mitochondrial Function and Insulin Sensitivity in Human Obesity and Diabetes Mellitus." *Annu Rev Nutr* **36**: 337-367.
207. Komaki, E., S. Yamaguchi, I. Maru, M. Kinoshita, K. Kakehi, Y. Ohta and Y. Tsukada (2003). *Identification of Anti.ALPHA.Amylase Components from Olive Leaf Extracts*.
208. Komatsu, M., M. Takei, H. Ishii and Y. Sato (2013). "Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective." *Journal of Diabetes Investigation* **4**(6): 511-516.
209. Kong, Z., X. Fan, S. Sun, L. Song, Q. Shi and J. Nie (2016). "Comparison of High-Intensity Interval Training and Moderate-to-Vigorous Continuous Training for Cardiometabolic Health and Exercise Enjoyment in Obese Young Women: A Randomized Controlled Trial." *PLoS One* **11**(7): e0158589.
210. Kountouri, A. M., A. Mylona, A. C. Kaliora and N. K. Andrikopoulos (2007). "Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of *Olea europaea* (olives): Impact on plasma antioxidant status in humans." *Phytomedicine* **14**(10): 659-667.
211. Krauss, S., C.-Y. Zhang, L. Scorrano, L. T. Dalgaard, J. St-Pierre, S. T. Grey and B. B. Lowell (2003). "Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic β cell dysfunction." *The Journal of Clinical Investigation* **112**(12): 1831-1842.
212. Larsen, S., S. Skaaby, J. W. Helge and F. Dela (2014). "Effects of exercise training on mitochondrial function in patients with type 2 diabetes." *World J Diabetes* **5**(4): 482-492.
213. Lattanzio, V., P. A. Kroon, V. Linsalata and A. Cardinali (2009). "Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients." *Journal of Functional Foods* **1**(2): 131-144.
214. Laursen, P. B., C. M. Shing, J. M. Peake, J. S. Coombes and D. G. Jenkins (2005). "Influence of high-intensity interval training on adaptations in well-trained cyclists." *J Strength Cond Res* **19**(3): 527-533.
215. Lawrence, R. D. (1940). "Renal Threshold for Glucose: Normal and in Diabetics." *Br Med J* **1**(4140): 766-768.

216. Lee-Young, R. S., B. J. Canny, D. E. Myers and G. K. McConell (2009). "AMPK activation is fiber type specific in human skeletal muscle: effects of exercise and short-term exercise training." J Appl Physiol (1985) **107**(1): 283-289.
217. Lee, S., K. I. Keirse, R. Kirkland, Z. I. Grunewald, J. G. Fischer and C. B. de La Serre (2018). "Blueberry Supplementation Influences the Gut Microbiota, Inflammation, and Insulin Resistance in High-Fat-Diet-Fed Rats." The Journal of Nutrition **148**(2): 209-219.
218. Lee, S., Y. Park, K. C. Dellsperger and C. Zhang (2011). "Exercise training improves endothelial function via adiponectin-dependent and independent pathways in type 2 diabetic mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **301**(2): H306-314.
219. Lee, S., Y. Park and C. Zhang (2011). "Exercise Training Prevents Coronary Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetic Mice." Am J Biomed Sci **3**(4): 241-252.
220. Leiter, E. H. (2009). "Selecting the "right" mouse model for metabolic syndrome and type 2 diabetes research." Methods Mol Biol **560**: 1-17.
221. Leturque, A., M. Loizeau, S. Vaulont, M. Salminen and J. Girard (1996). "Improvement of insulin action in diabetic transgenic mice selectively overexpressing GLUT4 in skeletal muscle." Diabetes **45**(1): 23-27.
222. Levinger, I., C. S. Shaw, N. K. Stepto, S. Cassar, A. J. McAinch, C. Cheetham and A. J. Maiorana (2015). "What Doesn't Kill You Makes You Fitter: A Systematic Review of High-Intensity Interval Exercise for Patients with Cardiovascular and Metabolic Diseases." Clin Med Insights Cardiol **9**: 53-63.
223. Li, D., Y. Zhang, Y. Liu, R. Sun and M. Xia (2015). "Purified anthocyanin supplementation reduces dyslipidemia, enhances antioxidant capacity, and prevents insulin resistance in diabetic patients." J Nutr **145**(4): 742-748.
224. Li, L., R. Pan, R. Li, B. Niemann, A. C. Aurich, Y. Chen and S. Rohrbach (2011). "Mitochondrial biogenesis and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) deacetylation by physical activity: intact adipocytokine signaling is required." Diabetes **60**(1): 157-167.
225. Liakopoulos, G., S. Stavrianiakou and G. Karabourniotis (2006). "Trichome layers versus dehaired lamina of *Olea europaea* leaves: differences in flavonoid distribution, UV-absorbing capacity, and wax yield." Environmental and Experimental Botany **55**(3): 294-304.
226. Lian, W., L. G. Goh, C. H. Pin, S. Wee and H. C. Ye (1999). Correlates of leisure-time physical activity in an older population in Singapore.
227. Lièvre, H. and B. Guillot (1984). "Chrysanthellum americanum : une plante tropicale au service des vaisseaux, du foie et de l'orthodoxie des métabolismes lipo-protéiques." Revue du Jeune Médecin.
228. Lièvre, H., B. Guillot and E. Reymond (1984). "Chrysanthellum : un hépatotrope, normolipémiant et vasculotrope : confirmations et acquisitions." Journal du Jeune Praticien **7**.
229. Lilja, M., M. Mandić, W. Apró, M. Melin, K. Olsson, S. Rosenborg, T. Gustafsson and T. R. Lundberg (2017). "High doses of anti-inflammatory drugs compromise muscle strength and hypertrophic adaptations to resistance training in young adults." Acta Physiologica **222**(2): e12948.
230. Little, J. P. and M. E. Francois (2014). "High-intensity interval training for improving postprandial hyperglycemia." Res Q Exerc Sport **85**(4): 451-456.
231. Little, J. P., J. B. Gillen, M. E. Percival, A. Safdar, M. A. Tarnopolsky, Z. Punthakee, M. E. Jung and M. J. Gibala (2011). "Low-volume high-intensity interval training reduces hyperglycemia and increases muscle mitochondrial capacity in patients with type 2 diabetes." J Appl Physiol (1985) **111**(6): 1554-1560.
232. Little, J. P., A. Safdar, D. Bishop, M. A. Tarnopolsky and M. J. Gibala (2011). "An acute bout of high-intensity interval training increases the nuclear abundance of PGC-1alpha and activates mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **300**(6): R1303-1310.

233. Little, J. P., A. Safdar, G. P. Wilkin, M. A. Tarnopolsky and M. J. Gibala (2010). "A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms." *The Journal of Physiology* **588**(6): 1011-1022.
234. Lizcano, F. and D. Vargas (2016). "Biology of Beige Adipocyte and Possible Therapy for Type 2 Diabetes and Obesity." *International Journal of Endocrinology* **2016**: 10.
235. Lomonaco, R., C. Ortiz-Lopez, B. Orsak, A. Webb, J. Hardies, C. Darland, J. Finch, A. Gastaldelli, S. Harrison, F. Tio and K. Cusi (2012). "Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology* **55**(5): 1389-1397.
236. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the folin phenol reagent." *Journal of Biological Chemistry* **193**(1): 265-275.
237. Madsen, S. M., A. C. Thorup, K. Overgaard and P. B. Jeppesen (2015). "High Intensity Interval Training Improves Glycaemic Control and Pancreatic beta Cell Function of Type 2 Diabetes Patients." *PLoS One* **10**(8): e0133286.
238. Maillard, F., B. Pereira and N. Boisseau (2017). "Effect of High-Intensity Interval Training on Total, Abdominal and Visceral Fat Mass: A Meta-Analysis." *Sports Medicine*.
239. Malin, S. K. and B. Braun (2016). "Impact of Metformin on Exercise-Induced Metabolic Adaptations to Lower Type 2 Diabetes Risk." *Exerc Sport Sci Rev* **44**(1): 4-11.
240. Marcinko, K., S. R. Sikkema, M. C. Samaan, B. E. Kemp, M. D. Fullerton and G. R. Steinberg (2015). "High intensity interval training improves liver and adipose tissue insulin sensitivity." *Mol Metab* **4**(12): 903-915.
241. Marcinko, K. and G. R. Steinberg (2014). "The role of AMPK in controlling metabolism and mitochondrial biogenesis during exercise." *Exp Physiol* **99**(12): 1581-1585.
242. Marinova, E. M., A. Toneva and N. Yanishlieva (2009). "Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acids." *Food Chemistry* **114**(4): 1498-1502.
243. Markworth, J. F., L. D. Vella, V. C. Figueiredo and D. Cameron-Smith (2014). "Ibuprofen treatment blunts early translational signaling responses in human skeletal muscle following resistance exercise." *Journal of Applied Physiology* **117**(1): 20-28.
244. Martinez, N., M. W. Kilpatrick, K. Salomon, M. E. Jung and J. P. Little (2015). "Affective and Enjoyment Responses to High-Intensity Interval Training in Overweight-to-Obese and Insufficiently Active Adults." *J Sport Exerc Psychol* **37**(2): 138-149.
245. Masharani, U. B., B. A. Maddux, X. Li, G. K. Sakkas, K. Mulligan, M. Schambelan, I. D. Goldfine and J. F. Youngren (2011). "Insulin Resistance in Non-Obese Subjects Is Associated with Activation of the JNK Pathway and Impaired Insulin Signaling in Skeletal Muscle." *PLoS One* **6**(5): e19878.
246. Matsuda, M., R. A. DeFronzo, L. Glass, A. Consoli, M. Giordano, P. Bressler and S. Delprato (2002). "Glucagon dose-response curve for hepatic glucose production and glucose disposal in type 2 diabetic patients and normal individuals." *Metabolism* **51**(9): 1111-1119.
247. Matsuda, M., Y. Liu, S. Mahankali, Y. Pu, A. Mahankali, J. Wang, R. A. DeFronzo, P. T. Fox and J. H. Gao (1999). "Altered hypothalamic function in response to glucose ingestion in obese humans." *Diabetes* **48**(9): 1801-1806.
248. Matsuzaka, T. and H. Shimano (2011). "Molecular mechanisms involved in hepatic steatosis and insulin resistance." *Journal of Diabetes Investigation* **2**(3): 170-175.
249. Matthews, D. R., J. P. Hosker, A. S. Rudenski, B. A. Naylor, D. F. Treacher and R. C. Turner (1985). "Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man." *Diabetologia* **28**(7): 412-419.
250. McCarty, M. F., J. J. DiNicolantonio and J. H. O'Keefe (2015). "Capsaicin may have important potential for promoting vascular and metabolic health." *Open Heart* **2**(1): e000262.
251. McDougall, G. J., N. N. Kulkarni and D. Stewart (2008). "Current developments on the inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes." *Biofactors* **34**(1): 73-80.
252. McGee, S. L. and M. Hargreaves (2011). "Histone modifications and exercise adaptations." *J Appl Physiol* (1985) **110**(1): 258-263.

253. Meier, J. J., K. Hucking, J. J. Holst, C. F. Deacon, W. H. Schmiegel and M. A. Nauck (2001). "Reduced insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes." *Diabetes* **50**(11): 2497-2504.
254. Meier, P., M. Renga, H. Hoppeler and O. Baum (2013). "The impact of antioxidant supplements and endurance exercise on genes of the carbohydrate and lipid metabolism in skeletal muscle of mice." *Cell Biochem Funct* **31**(1): 51-59.
255. Mendes, R., N. Sousa, A. Almeida, P. Subtil, F. Guedes-Marques, V. M. Reis and J. L. Themudo-Barata (2016). "Exercise prescription for patients with type 2 diabetes—a synthesis of international recommendations: narrative review." *British Journal of Sports Medicine* **50**(22): 1379-1381.
256. Merry, T. L. and M. Ristow (2016). "Do antioxidant supplements interfere with skeletal muscle adaptation to exercise training?" *The Journal of Physiology* **594**(18): 5135-5147.
257. Mishin, V., J. P. Gray, D. E. Heck, D. L. Laskin and J. D. Laskin (2010). "Application of the Amplex Red/Horseradish Peroxidase Assay to Measure Hydrogen Peroxide Generation by Recombinant Microsomal Enzymes." *Free radical biology & medicine* **48**(11): 1485-1491.
258. Miura, T., W. Suzuki, E. Ishihara, I. Arai, H. Ishida, Y. Seino and K. Tanigawa (2001). "Impairment of insulin-stimulated GLUT4 translocation in skeletal muscle and adipose tissue in the Tsumura Suzuki obese diabetic mouse: a new genetic animal model of type 2 diabetes." *Eur J Endocrinol* **145**(6): 785-790.
259. Mogensen, M., K. Sahlin, M. Fernstrom, D. Glintborg, B. F. Vind, H. Beck-Nielsen and K. Hojlund (2007). "Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes." *Diabetes* **56**(6): 1592-1599.
260. Moir, L., L. Bentley and R. D. Cox (2011). *Comprehensive Energy Balance Measurements in Mice. Current Protocols in Mouse Biology*, John Wiley & Sons, Inc.
261. Montgomery, M. K. and N. Turner (2015). "Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update." *Endocr Connect* **4**(1): R1-R15.
262. Mori, Y., Y. Murakawa, K. Okada, H. Horikoshi, J. Yokoyama, N. Tajima and Y. Ikeda (1999). "Effect of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetic patients." *Diabetes Care* **22**(6): 908-912.
263. Morino, K., K. F. Petersen, S. Dufour, D. Befroy, J. Frattini, N. Shatzkes, S. Neschen, M. F. White, S. Bilz, S. Sono, M. Pypaert and G. I. Shulman (2005). "Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents." *J Clin Invest* **115**(12): 3587-3593.
264. Mumu, S. J., F. Saleh, F. Ara, F. Afnan and L. Ali (2014). "Non-adherence to life-style modification and its factors among type 2 diabetic patients." *Indian J Public Health* **58**(1): 40-44.
265. Murphy, G. J. and J. C. Holder (2000). "PPAR- γ agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer." *Trends in Pharmacological Sciences* **21**(12): 469-474.
266. Myette-Côté, É., T. Terada and N. G. Boulé "The Effect of Exercise with or Without Metformin on Glucose Profiles in Type 2 Diabetes: A Pilot Study." *Canadian Journal of Diabetes* **40**(2): 173-177.
267. Mykkänen, O. T., A. Huotari, K.-H. Herzig, T. W. Dunlop, H. Mykkänen and P. V. Kirjavainen (2014). "Wild Blueberries (*Vaccinium myrtillus*) Alleviate Inflammation and Hypertension Associated with Developing Obesity in Mice Fed with a High-Fat Diet." *PLoS One* **9**(12): e114790.
268. Narayan, K. M. V., P. Zhang, A. M. Kanaya, D. E. Williams, M. M. Engelgau, G. Imperatore and A. Ramachandran (2006). "Diabetes: The Pandemic and Potential Solutions."
269. Nathan, D. M., M. B. Davidson, R. A. DeFronzo, R. J. Heine, R. R. Henry, R. Pratley and B. Zinman (2007). "Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: implications for care." *Diabetes Care* **30**(3): 753-759.
270. Nazni, P., T. P. Vijayakumar, P. Alagianambi and M. Amirthaveni (2006). "Hypoglycemic and hypolipidemic effect of cynara scolymus among selected type 2 diabetic individuals." *Pakistan Journal of Nutrition* **5**: 147-151.

271. Noorafshan, A., L. Hoseini, S. Karbalay-Doust and E. Nadimi (2012). "A simple stereological method for estimating the number and the volume of the pancreatic beta cells." *JOP* **13**(4): 427-432.
272. Nourooz-Zadeh, J., A. Rahimi, J. Tajaddini-Sarmadi, H. Tritschler, P. Rosen, B. Halliwell and D. J. Betteridge (1997). "Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM." *Diabetologia* **40**(6): 647-653.
273. Nyholm, B., Z. Qu, A. Kaal, S. B. Pedersen, C. H. Gravholt, J. L. Andersen, B. Saltin and O. Schmitz (1997). "Evidence of an increased number of type IIb muscle fibers in insulin-resistant first-degree relatives of patients with NIDDM." *Diabetes* **46**(11): 1822-1828.
274. Obrosova, I. G., O. Ilytska, V. V. Lyzogubov, I. A. Pavlov, N. Mashtalir, J. L. Nadler and V. R. Drel (2007). "High-Fat Diet-Induced Neuropathy of Pre-Diabetes and Obesity." *Diabetes* **56**(10): 2598.
275. Oi-Kano, Y., T. Kawada, T. Watanabe, F. Koyama, K. Watanabe, R. Senbongi and K. Iwai (2008). Oleuropein, a Phenolic Compound in Extra Virgin Olive Oil, Increases Uncoupling Protein 1 Content in Brown Adipose Tissue and Enhances Noradrenaline and Adrenaline Secretions in Rats.
276. Omar, S. H. (2010). "Oleuropein in olive and its pharmacological effects." *Sci Pharm* **78**(2): 133-154.
277. Ong, J. M. and P. A. Kern (1989). "Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue." *J Clin Invest* **84**(1): 305-311.
278. Ostler, J. E., S. K. Maurya, J. Dials, S. R. Roof, S. T. Devor, M. T. Ziolo and M. Periasamy (2014). "Effects of insulin resistance on skeletal muscle growth and exercise capacity in type 2 diabetic mouse models." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **306**(6): E592-605.
279. Owen, M. R., E. Doran and A. P. Halestrap (2000). "Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain." *Biochem J* **348 Pt 3**: 607-614.
280. Ozcan, U., Q. Cao, E. Yilmaz, A. H. Lee, N. N. Iwakoshi, E. Ozdelen, G. Tuncman, C. Gorgun, L. H. Glimcher and G. S. Hotamisligil (2004). "Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes." *Science* **306**(5695): 457-461.
281. Park, K. S., T. P. Ciaraldi, L. Abrams-Carter, S. Mudaliar, S. E. Nikoulina and R. R. Henry (1997). "PPAR-gamma gene expression is elevated in skeletal muscle of obese and type II diabetic subjects." *Diabetes* **46**(7): 1230-1234.
282. Park, K. S., T. P. Ciaraldi, K. Lindgren, L. Abrams-Carter, S. Mudaliar, S. E. Nikoulina, S. R. Tufari, J. H. Veerkamp, A. Vidal-Puig and R. R. Henry (1998). "Troglitazone effects on gene expression in human skeletal muscle of type II diabetes involve up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma." *J Clin Endocrinol Metab* **83**(8): 2830-2835.
283. Patsouris, D., J.-J. Cao, G. Vial, A. Bravard, E. Lefai, A. Durand, C. Durand, M.-A. Chauvin, F. Laugerette, C. Debard, M.-C. Michalski, M. Laville, H. Vidal and J. Rieusset (2014). "Insulin Resistance is Associated with MCP1-Mediated Macrophage Accumulation in Skeletal Muscle in Mice and Humans." *PLoS One* **9**(10): e110653.
284. Patti, M. E., A. J. Butte, S. Crunkhorn, K. Cusi, R. Berria, S. Kashyap, Y. Miyazaki, I. Kohane, M. Costello, R. Saccone, E. J. Landaker, A. B. Goldfine, E. Mun, R. DeFronzo, J. Finlayson, C. R. Kahn and L. J. Mandarino (2003). "Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8466-8471.
285. Paynter, N. P., H.-C. Yeh, S. Voutilainen, M. Schmidt, G. Heiss, A. R. Folsom, F. L. Brancati and W. H. Linda Kao (2007). Coffee and Sweetened Beverage Consumption and the Risk of Type 2 Diabetes Mellitus The Atherosclerosis Risk in Communities Study.
286. Pedersen, L. and P. Hojman (2012). "Muscle-to-organ cross talk mediated by myokines." *Adipocyte* **1**(3): 164-167.

287. Pedersen, O., J. F. Bak, P. H. Andersen, S. Lund, D. E. Moller, J. S. Flier and B. B. Kahn (1990). "Evidence against altered expression of GLUT1 or GLUT4 in skeletal muscle of patients with obesity or NIDDM." *Diabetes* **39**(7): 865-870.
288. Pedersen, T. A., O. Bereshchenko, S. Garcia-Silva, O. Ermakova, E. Kurz, S. Mandrup, B. T. Porse and C. Nerlov (2007). "Distinct C/EBPalpha motifs regulate lipogenic and gluconeogenic gene expression in vivo." *The EMBO Journal* **26**(4): 1081-1093.
289. Pendyala, S., J. M. Walker and P. R. Holt (2012). "A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut." *Gastroenterology* **142**(5): 1100-1101 e1102.
290. Perry, C. G., G. J. Heigenhauser, A. Bonen and L. L. Spriet (2008). "High-intensity aerobic interval training increases fat and carbohydrate metabolic capacities in human skeletal muscle." *Appl Physiol Nutr Metab* **33**(6): 1112-1123.
291. Perry, R. J., V. T. Samuel, K. F. Petersen and G. I. Shulman (2014). "The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes." *Nature* **510**(7503): 84-91.
292. Perseghin, G., P. Scifo, F. De Cobelli, E. Pagliato, A. Battezzati, C. Arcelloni, A. Vanzulli, G. Testolin, G. Pozza, A. Del Maschio and L. Luzi (1999). "Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a 1H-13C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents." *Diabetes* **48**(8): 1600-1606.
293. Pesta, D. and E. Gnaiger (2012). "High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle." *Methods Mol Biol* **810**: 25-58.
294. Petersen, M. C., D. F. Vatner and G. I. Shulman (2017). "Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease." *Nat Rev Endocrinol* **13**(10): 572-587.
295. Petkov, V. and P. Manolov (1972). "Pharmacological analysis of the iridoid oleuropein." *Arzneimittelforschung* **22**(9): 1476-1486.
296. Phielix, E., V. B. Schrauwen-Hinderling, M. Mensink, E. Lenaers, R. Meex, J. Hoeks, M. E. Kooi, E. Moonen-Kornips, J. P. Sels, M. K. Hesselink and P. Schrauwen (2008). "Lower intrinsic ADP-stimulated mitochondrial respiration underlies in vivo mitochondrial dysfunction in muscle of male type 2 diabetic patients." *Diabetes* **57**(11): 2943-2949.
297. Pilegaard, H., B. Saltin and P. D. Neuffer (2003). "Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle." *The Journal of Physiology* **546**(Pt 3): 851-858.
298. Pittler, M. H. and E. Ernst (2002). "Artichoke leaf extract for treating hypercholesterolaemia." *Cochrane Database of Systematic Reviews*(3).
299. Plotnikoff, R., S. Costigan, N. Karunamuni and D. Lubans (2013). "Community-Based Physical Activity Interventions for Treatment of Type 2 Diabetes: A Systematic Review with Meta-Analysis." *Frontiers in Endocrinology* **4**(3).
300. Plum, L., B. F. Belgardt and J. C. Bruning (2006). "Central insulin action in energy and glucose homeostasis." *J Clin Invest* **116**(7): 1761-1766.
301. Prentki, M. and C. J. Nolan (2006). "Islet β cell failure in type 2 diabetes." *Journal of Clinical Investigation* **116**(7): 1802-1812.
302. Prieto, I., M. Hidalgo, A. B. Segarra, A. M. Martínez-Rodríguez, A. Cobo, M. Ramírez, H. Abriouel, A. Gálvez and M. Martínez-Cañamero (2018). "Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome." *PLoS One* **13**(1): e0190368.
303. Proks, P., F. Reimann, N. Green, F. Gribble and F. Ashcroft (2002). "Sulfonylurea stimulation of insulin secretion." *Diabetes* **51** Suppl 3: S368-376.
304. R. Jansz, E. and E. V. Packiyasoathy (1983). *Determination of Piperine in Pepper (Piper nigrum L.)*.
305. Rahmoune, H., P. W. Thompson, J. M. Ward, C. D. Smith, G. Hong and J. Brown (2005). "Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes." *Diabetes* **54**(12): 3427-3434.
306. Ramos, J. S., L. C. Dalleck, A. E. Tjonna, K. S. Beetham and J. S. Coombes (2015). "The Impact of High-Intensity Interval Training Versus Moderate-Intensity Continuous Training on Vascular Function: a Systematic Review and Meta-Analysis." *Sports Medicine* **45**(5): 679-692.

307. Rask-Madsen, C. and G. L. King (2013). "Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors." *Cell Metabolism* **17**(1): 20-33.
308. Rebello, C. J., J. Burton, M. Heiman and F. L. Greenway (2015). "Gastrointestinal microbiome modulator improves glucose tolerance in overweight and obese subjects: A randomized controlled pilot trial." *J Diabetes Complications* **29**(8): 1272-1276.
309. Reddy, J. K. and M. Sambasiva Rao (2006). "Lipid Metabolism and Liver Inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **290**(5): G852-G858.
310. Reiner, Z., A. L. Catapano, G. De Backer, I. Graham, M. R. Taskinen, O. Wiklund, S. Agewall, E. Alegria, M. John Chapman, P. Durrington, S. Erdine, J. Halcox, R. Hobbs, J. Kjekshus, P. Perrone Filardi, G. Riccardi, R. F. Storey and D. Wood (2011). "ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias." *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* **64**(12): 1168.
311. Ren, J. M., B. A. Marshall, M. M. Mueckler, M. McCaleb, J. M. Amatruda and G. I. Shulman (1995). "Overexpression of Glut4 protein in muscle increases basal and insulin-stimulated whole body glucose disposal in conscious mice." *J Clin Invest* **95**(1): 429-432.
312. Ribon, V. and A. R. Saltiel (1997). "Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes." *Biochemical Journal* **324**(3): 839-846.
313. Ringseis, R., K. Eder, F. C. Mooren and K. Kruger (2015). "Metabolic signals and innate immune activation in obesity and exercise." *Exerc Immunol Rev* **21**: 58-68.
314. Ritov, V. B., E. V. Menshikova, J. He, R. E. Ferrell, B. H. Goodpaster and D. E. Kelley (2005). "Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes." *Diabetes* **54**(1): 8-14.
315. Roberts, C. K., J. P. Little and J. P. Thyfault (2013). "Modification of insulin sensitivity and glycemic control by activity and exercise." *Med Sci Sports Exerc* **45**(10): 1868-1877.
316. Robinson, C., W. V. Tamborlane, D. G. Maggs, S. Enoksson, R. S. Sherwin, D. Silver, G. I. Shulman and S. Caprio (1998). "Effect of insulin on glycerol production in obese adolescents." *Am J Physiol* **274**(4 Pt 1): E737-743.
317. Rognum, O., T. Moholdt, H. Bakken, T. Hole, P. Molstad, N. E. Myhr, J. Grimsmo and U. Wisloff (2012). "Cardiovascular risk of high- versus moderate-intensity aerobic exercise in coronary heart disease patients." *Circulation* **126**(12): 1436-1440.
318. Rydén, L., P. J. Grant, S. D. Anker, C. Berne, F. Cosentino, N. Danchin, C. Deaton, J. Escaned, H.-P. Hammes, H. Huikuri, M. Marre, N. Marx, L. Mellbin, J. Ostergren, C. Patrono, P. Seferovic, M. S. Uva, M.-R. Taskinen, M. Tendera, J. Tuomilehto, P. Valensi, J. L. Zamorano, E. S. C. C. f. P. Guidelines, S. Achenbach, H. Baumgartner, J. J. Bax, H. Bueno, V. Dean, Ç. Erol, R. Fagard, R. Ferrari, D. Hasdai, A. W. Hoes, P. Kirchhof, J. Knuuti, P. Kolh, P. Lancellotti, A. Linhart, P. Nihoyannopoulos, M. F. Piepoli, P. Ponikowski, P. A. Sirnes, J. L. Tamargo, A. Torbicki, W. Wijns, S. Windecker, R. Document, G. De Backer, E. A. Ezquerro, A. Avogaro, L. Badimon, E. Baranova, J. Betteridge, A. Ceriello, C. Funck-Brentano, D. C. Gulba, J. K. Kjekshus, E. Lev, C. Mueller, L. Neyses, P. M. Nilsson, J. Perk, Ž. Reiner, N. Sattar, V. Schächinger, A. Scheen, H. Schirmer, A. Strömberg, S. Sudzhaeva, M. Viigimaa, C. Vlachopoulos and R. G. Xuereb (2013). "ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD The Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD)." *European Heart Journal* **34**(39): 3035-3087.
319. Ryder, J. W., Y. KAWANO, D. GALUSKA, R. FAHLMAN, H. WALLBERG-HENRIKSSON, M. J. CHARRON and J. R. ZIERATH (1999). "Postexercise glucose uptake and glycogen synthesis in skeletal muscle from GLUT4-deficient mice." *The FASEB Journal* **13**(15): 2246-2256.
320. Saenz Rodriguez, T., D. Garcia Gimenez and R. de la Puerta Vazquez (2002). "Choleretic activity and biliary elimination of lipids and bile acids induced by an artichoke leaf extract in rats." *Phytomedicine* **9**(8): 687-693.
321. Saini, V. (2010). "Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus." *World Journal of Diabetes* **1**(3): 68-75.

- 322.** Salpeter, S. R., E. Greyber, G. A. Pasternak and E. E. Salpeter (2003). "Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus: Systematic review and meta-analysis." *Archives of Internal Medicine* **163**(21): 2594-2602.
- 323.** Sampath, S. C., S. C. Sampath, M. A. Bredella, A. M. Cypess and M. Torriani (2016). "Imaging of Brown Adipose Tissue: State of the Art." *Radiology* **280**(1): 4-19.
- 324.** Samuel, V. T., K. F. Petersen and G. I. Shulman (2010). "Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism." *Lancet* **375**(9733): 2267-2277.
- 325.** Samuel, V. T. and G. I. Shulman (2012). "Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links." *Cell* **148**(5): 852-871.
- 326.** Sanz, C., J. F. Gautier and H. Hanaire (2010). "Physical exercise for the prevention and treatment of type 2 diabetes." *Diabetes Metab* **36**(5): 346-351.
- 327.** Scazzocchio, B., R. Vari, C. Filesi, M. D'Archivio, C. Santangelo, C. Giovannini, A. Iacovelli, G. Silecchia, G. L. Volti, F. Galvano and R. Masella (2011). "Cyanidin-3-O- β -Glucoside and Protocatechuic Acid Exert Insulin-Like Effects by Upregulating PPAR γ Activity in Human Omental Adipocytes." *Diabetes* **60**(9): 2234-2244.
- 328.** Schafer, S. A., F. Machicao, A. Fritsche, H. U. Haring and K. Kantartzis (2011). "New type 2 diabetes risk genes provide new insights in insulin secretion mechanisms." *Diabetes Res Clin Pract* **93** **Suppl 1**: S9-24.
- 329.** Scheen, A. J. (1998). "Clinical efficacy of acarbose in diabetes mellitus: a critical review of controlled trials." *Diabetes Metab* **24**(4): 311-320.
- 330.** Seeram, N. P. (2008). "Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease." *J Agric Food Chem* **56**(3): 627-629.
- 331.** Seino, S. (2012). "Cell signalling in insulin secretion: the molecular targets of ATP, cAMP and sulfonylurea." *Diabetologia* **55**(8): 2096-2108.
- 332.** Sennott, J., J. Morrissey, P. R. Standley and T. L. Broderick (2008). "Treadmill exercise training fails to reverse defects in glucose, insulin and muscle GLUT4 content in the db/db mouse model of diabetes." *Pathophysiology* **15**(3): 173-179.
- 333.** Seymour, E. M., Tanone, II, D. E. Urcuyo-Llanes, S. K. Lewis, A. Kirakosyan, M. G. Kondoleon, P. B. Kaufman and S. F. Bolling (2011). "Blueberry intake alters skeletal muscle and adipose tissue peroxisome proliferator-activated receptor activity and reduces insulin resistance in obese rats." *J Med Food* **14**(12): 1511-1518.
- 334.** Shaban, N., K. A. Kenno and K. J. Milne (2014). "The effects of a 2 week modified high intensity interval training program on the homeostatic model of insulin resistance (HOMA-IR) in adults with type 2 diabetes." *J Sports Med Phys Fitness* **54**(2): 203-209.
- 335.** Shevalye, H., S. Lupachyk, P. Watcho, R. Stavniichuk, K. Khazim, H. E. Abboud and I. G. Obrosova (2012). "Prediabetic Nephropathy as an Early Consequence of the High-Calorie/High-Fat Diet: Relation to Oxidative Stress." *Endocrinology* **153**(3): 1152-1161.
- 336.** Shiraev, T. and G. Barclay (2012). "Evidence based exercise - clinical benefits of high intensity interval training." *Aust Fam Physician* **41**(12): 960-962.
- 337.** Shoba, G., D. Joy, T. Joseph, M. Majeed, R. Rajendran and P. S. Srinivas (1998). "Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers." *Planta Med* **64**(4): 353-356.
- 338.** Shoback, D. and D. Gardner (2011). *Greenspan's basic & clinical endocrinology* (9th ed.).
- 339.** Shoelson, S. E., J. Lee and A. B. Goldfine (2006). "Inflammation and insulin resistance." *J Clin Invest* **116**(7): 1793-1801.
- 340.** Shubrook, J. H., B. B. Bokaie and S. E. Adkins (2015). "Empagliflozin in the treatment of type 2 diabetes: evidence to date." *Drug Design, Development and Therapy* **9**: 5793-5803.
- 341.** Shulman, G. I., D. L. Rothman, T. Jue, P. Stein, R. A. DeFronzo and R. G. Shulman (1990). "Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy." *N Engl J Med* **322**(4): 223-228.

- 342.** Sidossis, L. and S. Kajimura (2015). "Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis." The Journal of Clinical Investigation **125**(2): 478-486.
- 343.** Silva, S., L. Gomes, F. Leitão, A. V. Coelho and L. V. Boas (2006). "Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves." Food Science and Technology International **12**(5): 385-395.
- 344.** Simoneau, J.-A. and D. E. Kelley (1997). "Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM." Journal of Applied Physiology **83**(1): 166-171.
- 345.** Simoneau, J.-A., J. H. Veerkamp, L. P. Turcotte and D. E. Kelley (1999). "Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss." FASEB J **13**(14): 2051-2060.
- 346.** Siu, P. M., D. A. Donley, R. W. Bryner and S. E. Alway (2003). "Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles." Journal of Applied Physiology **94**(2): 555-560.
- 347.** Snijder, M. B., M. Visser, J. M. Dekker, B. H. Goodpaster, T. B. Harris, S. B. Kritchevsky, N. De Rekeneire, A. M. Kanaya, A. B. Newman, F. A. Tylavsky and J. C. Seidell (2005). "Low subcutaneous thigh fat is a risk factor for unfavourable glucose and lipid levels, independently of high abdominal fat. The Health ABC Study." Diabetologia **48**(2): 301-308.
- 348.** Solanes, G., A. Vidal-Puig, D. Grujic, J. S. Flier and B. B. Lowell (1997). "The human uncoupling protein-3 gene. Genomic structure, chromosomal localization, and genetic basis for short and long form transcripts." J Biol Chem **272**(41): 25433-25436.
- 349.** Spiegelman, B. M. (1998). "PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor." Diabetes **47**(4): 507-514.
- 350.** Srere, P. A. (1969). "Citrate synthase." Methods in Enzymology **13**: 3-11.
- 351.** Sriwijitkamol, A., C. Christ-Roberts, R. Berria, P. Eagan, T. Pratipanawat, R. A. DeFronzo, L. J. Mandarino and N. Musi (2006). "Reduced Skeletal Muscle Inhibitor of κB Content Is Associated With Insulin Resistance in Subjects With Type 2 Diabetes." Reversal by Exercise Training **55**(3): 760-767.
- 352.** Stanford, K. I., R. J. W. Middelbeek and L. J. Goodyear (2015). "Exercise Effects on White Adipose Tissue: Beiging and Metabolic Adaptations." Diabetes **64**(7): 2361-2368.
- 353.** Stanford, K. I., R. J. W. Middelbeek, K. L. Townsend, M.-Y. Lee, H. Takahashi, K. So, K. M. Hitchcox, K. R. Markan, K. Hellbach, M. F. Hirshman, Y.-H. Tseng and L. J. Goodyear (2015). "A Novel Role for Subcutaneous Adipose Tissue in Exercise-Induced Improvements in Glucose Homeostasis." Diabetes **64**(6): 2002-2014.
- 354.** Steckling, F. M., J. B. Farinha, D. L. Santos, G. Bresciani, J. A. Mortari, S. T. Stefanello, A. A. Courtes, T. Duarte, M. M. Duarte, R. N. Moresco, M. S. Cardoso and F. A. Soares (2016). "High Intensity Interval Training Reduces the Levels of Serum Inflammatory Cytokine on Women with Metabolic Syndrome." Exp Clin Endocrinol Diabetes.
- 355.** Stefan, N., M. Stumvoll, C. Bogardus and P. A. Tataranni (2003). "Elevated plasma nonesterified fatty acids are associated with deterioration of acute insulin response in IGT but not NGT." American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism **284**(6): E1156-E1161.
- 356.** Stephens, N. A. and L. M. Sparks (2015). "Resistance to the beneficial effects of exercise in type 2 diabetes: are some individuals programmed to fail?" J Clin Endocrinol Metab **100**(1): 43-52.
- 357.** Stephens, N. A., H. Xie, N. M. Johannsen, T. S. Church, S. R. Smith and L. M. Sparks (2015). "A transcriptional signature of "exercise resistance" in skeletal muscle of individuals with type 2 diabetes mellitus." Metabolism **64**(9): 999-1004.
- 358.** Stephenson, E. J., D. M. Camera, T. A. Jenkins, S. Kosari, J. S. Lee, J. A. Hawley and N. K. Stepto (2012). "Skeletal muscle respiratory capacity is enhanced in rats consuming an obesogenic Western diet." Am J Physiol Endocrinol Metab **302**(12): E1541-1549.
- 359.** Stohs, S. J. and V. Badmaev (2016). "A Review of Natural Stimulant and Non-stimulant Thermogenic Agents." Phytotherapy Research **30**(5): 732-740.

- 360.** Stolen, T. O., M. A. Hoydal, O. J. Kemi, D. Catalucci, M. Ceci, E. Aasum, T. Larsen, N. Rolim, G. Condorelli, G. L. Smith and U. Wisloff (2009). "Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca²⁺ control, and SR Ca²⁺ release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy." *Circ Res* **105**(6): 527-536.
- 361.** Strobel, N. A., J. M. Peake, A. Matsumoto, S. A. Marsh, J. S. Coombes and G. D. Wadley (2011). "Antioxidant supplementation reduces skeletal muscle mitochondrial biogenesis." *Med Sci Sports Exerc* **43**(6): 1017-1024.
- 362.** Stull, A. J. (2016). "Blueberries' Impact on Insulin Resistance and Glucose Intolerance." *Antioxidants* **5**(4): 44.
- 363.** Stull, A. J., K. C. Cash, C. M. Champagne, A. K. Gupta, R. Boston, R. A. Beyl, W. D. Johnson and W. T. Cefalu (2015) "Blueberries improve endothelial function, but not blood pressure, in adults with metabolic syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial." *Nutrients* **7**, 4107-4123 DOI: 10.3390/nu7064107.
- 364.** Stull, A. J., K. C. Cash, W. D. Johnson, C. M. Champagne and W. T. Cefalu (2010). "Bioactives in blueberries improve insulin sensitivity in obese, insulin-resistant men and women." *J Nutr* **140**(10): 1764-1768.
- 365.** Sulkin, T. V., D. Bosman and A. J. Krentz (1997). "Contraindications to Metformin Therapy in Patients With NIDDM." *Diabetes Care* **20**(6): 925-928.
- 366.** Szendroedi, J., E. Phielix and M. Roden (2011). "The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus." *Nat Rev Endocrinol* **8**(2): 92-103.
- 367.** Tabak, A. G., C. Herder, W. Rathmann, E. J. Brunner and M. Kivimaki (2012). "Prediabetes: a high-risk state for diabetes development." *Lancet* **379**(9833): 2279-2290.
- 368.** Tajik, N., M. Tajik, I. Mack and P. Enck (2017). "The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature." *European Journal of Nutrition* **56**(7): 2215-2244.
- 369.** Takikawa, M., S. Inoue, F. Horio and T. Tsuda (2010). "Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice." *J Nutr* **140**(3): 527-533.
- 370.** Tanko, L. B., Y. Z. Bagger, P. Alexandersen, P. J. Larsen and C. Christiansen (2003). "Peripheral adiposity exhibits an independent dominant antiatherogenic effect in elderly women." *Circulation* **107**(12): 1626-1631.
- 371.** Taylor, S. I., A. Cama, D. Accili, F. Barbetti, E. Imano, H. Kadowaki and T. Kadowaki (1991). "Genetic basis of endocrine disease. 1. Molecular genetics of insulin resistant diabetes mellitus." *J Clin Endocrinol Metab* **73**(6): 1158-1163.
- 372.** Teixeira, T. F., M. C. Collado, C. L. Ferreira, J. Bressan and C. Peluzio Mdo (2012). "Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability." *Nutr Res* **32**(9): 637-647.
- 373.** Thiebaud, D., E. Jacot, R. A. Defronzo, E. Maeder, E. Jequier and J.-P. Felber (1982). "The Effect of Graded Doses of Insulin on Total Glucose Uptake, Glucose Oxidation, and Glucose Storage in Man." *Diabetes* **31**(11): 957-963.
- 374.** Thum, J. S., G. Parsons, T. Whittle and T. A. Astorino (2017). "High-Intensity Interval Training Elicits Higher Enjoyment than Moderate Intensity Continuous Exercise." *PLoS One* **12**(1): e0166299.
- 375.** Thyagarajan, B. and T. Foster Michelle (2017). Beiging of white adipose tissue as a therapeutic strategy for weight loss in humans. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, **31**.
- 376.** Toft-Nielsen, M. B., M. B. Damholt, S. Madsbad, L. M. Hilsted, T. E. Hughes, B. K. Michelsen and J. J. Holst (2001). "Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(8): 3717-3723.
- 377.** Torres-Leal, F. L., M. H. Fonseca-Alaniz, A. Cunha de Oliveira and M. I. C. Alonso-Vale (2012). Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance. D. S. A. (Ed.), InTech.
- 378.** Tosi, F., D. Di Sarra, J.-M. Kaufman, C. Bonin, R. Moretta, E. Bonora, E. Zanolin and P. Moghetti (2015). "Total Body Fat and Central Fat Mass Independently Predict Insulin Resistance but Not

- Hyperandrogenemia In Women With Polycystic Ovary Syndrome." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **100**(2): 661-669.
- 379.** Trapp, E. G., D. J. Chisholm, J. Freund and S. H. Boutcher (2008). "The effects of high-intensity intermittent exercise training on fat loss and fasting insulin levels of young women." Int J Obes (Lond) **32**(4): 684-691.
- 380.** Trask, A. J., M. A. Delbin, P. S. Katz, A. Zanesco and P. A. Lucchesi (2012). "Differential coronary resistance microvessel remodeling between type 1 and type 2 diabetic mice: impact of exercise training." Vascul Pharmacol **57**(5-6): 187-193.
- 381.** Trost, S., N. Owen, A. Bauman, J. F Sallis and W. Brown (2003). Correlates of adults' participation in physical activity: Review and update.
- 382.** Tseng, E., H.-C. Yeh and N. M. Maruthur (2017). "Metformin Use in Prediabetes Among U.S. Adults, 2005–2012." Diabetes Care **40**(7): 887-893.
- 383.** Tuomilehto, J., J. Lindstrom, J. G. Eriksson, T. T. Valle, H. Hamalainen, P. Ilanne-Parikka, S. Keinanen-Kiukaanniemi, M. Laakso, A. Louheranta, M. Rastas, V. Salminen and M. Uusitupa (2001). "Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance." N Engl J Med **344**(18): 1343-1350.
- 384.** Turner, N., G. M. Kowalski, S. J. Leslie, S. Risis, C. Yang, R. S. Lee-Young, J. R. Babb, P. J. Meikle, G. I. Lancaster, D. C. Henstridge, P. J. White, E. W. Kraegen, A. Marette, G. J. Cooney, M. A. Febbraio and C. R. Bruce (2013). "Distinct patterns of tissue-specific lipid accumulation during the induction of insulin resistance in mice by high-fat feeding." Diabetologia **56**(7): 1638-1648.
- 385.** Tuso, P. (2014). "Prediabetes and Lifestyle Modification: Time to Prevent a Preventable Disease." The Permanente Journal **18**(3): 88-93.
- 386.** Tuso, P. (2014). "Treatment progress indicator: application of a new assessment tool to objectively monitor the therapeutic progress of patients with depression, anxiety, or behavioral health impairment." Perm J **18**(3): 55-59.
- 387.** Umar, S., A. H. M. Golam Sarwar, K. Umar, N. Ahmad, M. Sajad, S. Ahmad, C. K. Katiyar and H. A. Khan (2013). "Piperine ameliorates oxidative stress, inflammation and histological outcome in collagen induced arthritis." Cellular Immunology **284**(1): 51-59.
- 388.** Umpierre, D., P. A. Ribeiro, B. D. Schaun and J. P. Ribeiro (2013). "Volume of supervised exercise training impacts glycaemic control in patients with type 2 diabetes: a systematic review with meta-regression analysis." Diabetologia **56**(2): 242-251.
- 389.** Unger, J. R. and C. G. Parkin (2011). "Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists: Differentiating the new medications." Diabetes Therapy **2**(1): 29-39.
- 390.** Unger, R. H., E. Aguilar-Parada, W. A. Muller and A. M. Eisentraut (1970). "Studies of pancreatic alpha cell function in normal and diabetic subjects." J Clin Invest **49**(4): 837-848.
- 391.** Van Obberghen, E., V. Baron, L. Delahaye, B. Emanuelli, N. Filippa, S. Giorgetti-Peraldi, P. Lebrun, I. Mothe-Satney, P. Peraldi, S. Rocchi, D. Sawka-Verhelle, S. Tartare-Deckert and J. Giudicelli (2001). "Surfing the insulin signaling web." Eur J Clin Invest **31**(11): 966-977.
- 392.** Vella, C. A., K. Taylor and D. Drummer (2017). "High-intensity interval and moderate-intensity continuous training elicit similar enjoyment and adherence levels in overweight and obese adults." European Journal of Sport Science **17**(9): 1203-1211.
- 393.** Vendrame, S., A. Daugherty, A. S. Kristo and D. Klimis-Zacas (2014). "Wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*)-enriched diet improves dyslipidaemia and modulates the expression of genes related to lipid metabolism in obese Zucker rats." Br J Nutr **111**(2): 194-200.
- 394.** Vendrame, S., A. Daugherty, A. S. Kristo, P. Riso and D. Klimis-Zacas (2013). "Wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption improves inflammatory status in the obese Zucker rat model of the metabolic syndrome." J Nutr Biochem **24**(8): 1508-1512.
- 395.** Verney, J., M. Duclos and D. Thivel (2017). "Sprint Interval Training: What are the Clinical Implications and Precautions?" Med Sci Sports Exerc **49**(11): 2361-2362.
- 396.** Vijayakuma, R., D. Surya, R. Senthilkumar and N. Nalini (2002). "Hypolipidemic Effect of Black Pepper (*Piper nigrum* Linn.) in Rats Fed High Fat Diet." J. Clin. Biochem. Nutr **32**: 31-42.

397. Vijayakumar, R. and N. Nalini (2006). "Lipid-lowering efficacy of piperine from *Piper nigrum* L. in high-fat diet and antithyroid drug-induced hypercholesterolemic rats." Journal of Food Biochemistry **30**: 405-421.
398. Vijayakumar, R. S. and N. Nalini (2006). "Efficacy of piperine, an alkaloidal constituent from *Piper nigrum* on erythrocyte antioxidant status in high fat diet and antithyroid drug induced hyperlipidemic rats." Cell Biochem Funct **24**(6): 491-498.
399. Vionnet, N., M. Stoffel, J. Takeda, K. Yasuda, G. I. Bell, H. Zouali, S. Lesage, G. Velho, F. Iris, P. Passa and et al. (1992). "Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus." Nature **356**(6371): 721-722.
400. Vogel, P., I. Kasper Machado, J. Garavaglia, V. Terezinha Zani, D. Souza and S. Dal Bosco (2014). Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health.
401. Wainstein, J., T. Ganz, M. Boaz, Y. Bar Dayan, E. Dolev, Z. Kerem and Z. Madar (2012). Olive Leaf Extract as a Hypoglycemic Agent in Both Human Diabetic Subjects and in Rats.
402. Walley, A. J., A. I. Blakemore and P. Froguel (2006). "Genetics of obesity and the prediction of risk for health." Hum Mol Genet **15 Spec No 2**: R124-130.
403. Wang, W.-X., S.-B. Luo, M.-M. Xia, Y.-H. Mao, X.-Y. Zhou, P. Jiang, H.-Y. Jiang, D.-P. Dai, C.-B. Li, G.-X. Hu and J.-P. Cai (2015). "Analysis of the oxidative damage of DNA, RNA, and their metabolites induced by hyperglycemia and related nephropathy in Sprague Dawley rats." Free Radical Research **49**(10): 1199-1209.
404. Wang, X., W. Bao, J. Liu, Y.-Y. OuYang, D. Wang, S. Rong, X. Xiao, Z.-L. Shan, Y. Zhang, P. Yao and L.-G. Liu (2013). "Inflammatory Markers and Risk of Type 2 Diabetes." A systematic review and meta-analysis **36**(1): 166-175.
405. Watcho, P., R. Stavniichuk, D. M. Ribnicky, I. Raskin and I. G. Obrosova (2010). "High-Fat Diet-Induced Neuropathy of Prediabetes and Obesity: Effect of PMI-5011, an Ethanolic Extract of *Artemisia dracuncululus* L." Mediators of Inflammation **2010**: 268547.
406. Weir, J. B. d. V. (1949). "New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism." The Journal of Physiology **109**(1-2): 1-9.
407. Westerterp-Plantenga, M., K. Diepvens, A. M. C. P. Joosen, S. Bérubé-Parent and A. Tremblay (2006). "Metabolic effects of spices, teas, and caffeine." Physiology & Behavior **89**(1): 85-91.
408. Weston, K. S., U. Wisloff and J. S. Coombes (2014). "High-intensity interval training in patients with lifestyle-induced cardiometabolic disease: a systematic review and meta-analysis." Br J Sports Med **48**(16): 1227-1234.
409. WHO (2011). "Global Recommendations on Physical Activity for Health." World Health Organization.
410. Wider, B., M. H. Pittler, J. Thompson-Coon and E. Ernst (2009). "Artichoke leaf extract for treating hypercholesterolaemia." Cochrane Database of Systematic Reviews(4).
411. Wider, B., M. H. Pittler, J. Thompson-Coon and E. Ernst (2013). "Artichoke leaf extract for treating hypercholesterolaemia." Cochrane Database of Systematic Reviews(3).
412. Williams, L. M., F. M. Campbell, J. E. Drew, C. Koch, N. Hoggard, W. D. Rees, T. Kamolrat, H. Thi Ngo, I.-L. Steffensen, S. R. Gray and A. Tups (2014). "The Development of Diet-Induced Obesity and Glucose Intolerance in C57Bl/6 Mice on a High-Fat Diet Consists of Distinct Phases." PLoS One **9**(8): e106159.
413. Williams, M. (2006). "Dietary Supplements and Sports Performance: Herbals." Journal of the International Society of Sports Nutrition **3**(1): 1-6.
414. Winder, W. W. and D. G. Hardie (1999). "AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes." Am J Physiol **277**(1 Pt 1): E1-10.
415. Wisse, B. E. (2004). "The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity." J Am Soc Nephrol **15**(11): 2792-2800.
416. Wormgoor, S. G., L. C. Dalleck, C. Zinn and N. K. Harris (2017). "Effects of High-Intensity Interval Training on People Living with Type 2 Diabetes: A Narrative Review." Can J Diabetes.
417. Wu, J., P. Boström, L. M. Sparks, L. Ye, J. H. Choi, A.-H. Giang, M. Khandekar, P. Nuutila, G. Schaart, K. Huang, H. Tu, W. D. van Marken Lichtenbelt, J. Hoeks, S. Enerbäck, P. Schrauwen and B. M.

- Spiegelman (2012). "Beige Adipocytes are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human." *Cell* **150**(2): 366-376.
418. Wu, S., I. Hopper, M. Skiba and H. Krum (2014). "Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and cardiovascular outcomes: meta-analysis of randomized clinical trials with 55,141 participants." *Cardiovasc Ther* **32**(4): 147-158.
419. Xia, M., M. Hou, H. Zhu, J. Ma, Z. Tang, Q. Wang, Y. Li, D. Chi, X. Yu, T. Zhao, P. Han, X. Xia and W. Ling (2005). "Anthocyanins induce cholesterol efflux from mouse peritoneal macrophages: the role of the peroxisome proliferator-activated receptor $\{\gamma\}$ -liver X receptor $\{\alpha\}$ -ABCA1 pathway." *J Biol Chem* **280**(44): 36792-36801.
420. Yang, H.-M., C.-Y. Sun, J.-L. Liang, L.-Q. Xu, Z.-B. Zhang, D.-D. Luo, H.-B. Chen, Y.-Z. Huang, Q. Wang, D. Y.-W. Lee, J. Yuan and Y.-C. Li (2017). "Supercritical-Carbon Dioxide Fluid Extract from *Chrysanthemum indicum* Enhances Anti-Tumor Effect and Reduces Toxicity of Bleomycin in Tumor-Bearing Mice." *International Journal of Molecular Sciences* **18**(3): 465.
421. Yoo, K.-Y., I. Kim, J.-H. Cho, J. Ahn, J. Park, J.-C. Lee, H.-J. Tae, D. Kim, J.-D. Kim, S. Hong, M.-H. Won and I. Kang (2016). "Neuroprotection of *Chrysanthemum indicum* Linne against cerebral ischemia/reperfusion injury by anti-inflammatory effect in gerbils." *Neural Regeneration Research* **11**(2): 270-277.
422. Yu, C., Y. Chen, G. W. Cline, D. Zhang, H. Zong, Y. Wang, R. Bergeron, J. K. Kim, S. W. Cushman, G. J. Cooney, B. Atcheson, M. F. White, E. W. Kraegen and G. I. Shulman (2002). "Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle." *J Biol Chem* **277**(52): 50230-50236.
423. Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature* **372**(6505): 425-432.
424. Zhong, Y., J. Wang, P. Gu, J. Shao, B. Lu and S. Jiang (2012). "Effect of Ezetimibe on Insulin Secretion in db/db Diabetic Mice." *Experimental Diabetes Research* **2012**: 420854.
425. Zhu, Y., W. Ling, H. Guo, F. Song, Q. Ye, T. Zou, D. Li, Y. Zhang, G. Li, Y. Xiao, F. Liu, Z. Li, Z. Shi and Y. Yang (2013). "Anti-inflammatory effect of purified dietary anthocyanin in adults with hypercholesterolemia: a randomized controlled trial." *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **23**(9): 843-849.
426. Zierath, J. R., T. S. Tsao, A. E. Stenbit, J. W. Ryder, D. Galuska and M. J. Charron (1998). "Restoration of hypoxia-stimulated glucose uptake in GLUT4-deficient muscles by muscle-specific GLUT4 transgenic complementation." *J Biol Chem* **273**(33): 20910-20915.
427. Zisman, A., O. D. Peroni, E. D. Abel, M. D. Michael, F. Mauvais-Jarvis, B. B. Lowell, J. F. Wojtaszewski, M. F. Hirshman, A. Virkamaki, L. J. Goodyear, C. R. Kahn and B. B. Kahn (2000). "Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance." *Nat Med* **6**(8): 924-928.
428. Zorzano, A. (2009). "Regulation of mitofusin-2 expression in skeletal muscle." *Appl Physiol Nutr Metab* **34**(3): 433-439.
429. Zou, P. (2016). "Traditional Chinese Medicine, Food Therapy, and Hypertension Control: A Narrative Review of Chinese Literature." *The American Journal of Chinese Medicine* **44**(08): 1579-1594.

11. ANNEXES

11.1. STATISTIQUES COMPLETES ETUDE 2A FIGURE 19

ANOVA 3 Voies					
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Exercice	2	1,916	0,958	4,541	0,014
Insulin	1	10,367	10,367	49,140	< 0,0001
Site phospho	1	4,733	4,733	22,436	< 0,0001
Exercice*Insuline	2	1,339	0,669	3,173	0,048
Exercice*Site phospho	2	0,556	0,278	1,317	0,275
Insulin*Site phospho	1	3,208	3,208	15,207	0,000
Exercice*Insuline*Site phospho	2	0,632	0,316	1,497	0,231

Tableau 13 : ANOVA à 3 voies (Fig. 19)

Exercice / Newman-Keuls (SNK) / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	Significatif
HIIT vs. CON	0,325	2,597	2,396	0,031	Oui
HIIT vs. MICT	0,268	2,141	1,995	0,036	Oui
MICT vs. CON	0,057	0,456	1,995	0,650	Non

Tableau 14 : Test Post-hoc SNK - effet exercice (Fig. 19)

Exercice*Insuline / Newman-Keuls (SNK) / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	Significatif
HIIT*Ins vs. CON*Veh	1,145	6,460	2,931	< 0,0001	Oui
HIIT*Ins vs. HIIT*Veh	1,102	6,218	2,801	< 0,0001	Oui
HIIT*Ins vs. MICT*Veh	1,086	6,129	2,633	< 0,0001	Oui
HIIT*Ins vs. CON*Ins	0,607	3,427	2,396	0,003	Oui
HIIT*Ins vs. MICT*Ins	0,552	3,114	1,995	0,003	Oui
MICT*Ins vs. CON*Veh	0,593	3,346	2,801	0,011	Oui
MICT*Ins vs. HIIT*Veh	0,550	3,104	2,633	0,014	Oui
MICT*Ins vs. MICT*Veh	0,534	3,015	2,396	0,010	Oui
MICT*Ins vs. CON*Ins	0,056	0,313	1,995	0,755	Non
CON*Ins vs. CON*Veh	0,538	3,033	2,633	0,018	Oui
CON*Ins vs. HIIT*Veh	0,495	2,791	2,396	0,018	Oui
CON*Ins vs. MICT*Veh	0,479	2,702	1,995	0,009	Oui
MICT*Veh vs. CON*Veh	0,059	0,331	2,396	0,941	Non
MICT*Veh vs. HIIT*Veh	0,016	0,089			Non
HIIT*Veh vs. CON*Veh	0,043	0,242	1,995	0,809	Non

Tableau 15 : Post Hoc SNK - Effet insuline*exercice (Fig.19)

11.2. STATISTIQUES COMPLETES ETUDE 2B FIGURE 35

ANOVA mesures répétées	
Source of Variation	P value summary
Interaction	**
Time	*
Group	**
Subjects (matching)	****

Tableau 16 : ANOVA à mesures répétées sur prise alimentaire (fig. 32)

Prise alimentaire		CON			HF			HF-T63-FULL			HF-T63-ON/OFF		
		0 à 7	7 à 10	10 à 13	0 à 7	7 à 10	10 à 13	0 à 7	7 à 10	10 à 13	0 à 7	7 à 10	10 à 13
CON	0 à 7		**	*	NS			NS			NS		
	7 à 10			NS		****			*			NS	
	10 à 13						***			**			NS
HF	0 à 7					NS	NS	NS			NS		
	7 à 10						NS		NS			*	
	10 à 13									NS			NS
HF-T63-FULL	0 à 7								NS	NS	NS		
	7 à 10									NS		NS	
	10 à 13												NS
HF-T63-ON/OFF	0 à 7											*	*
	7 à 10												NS
	10 à 13												

Tableau 17 : Post-hoc Tukey sur prise alimentaire (fig. 32)

ANOVA mesures répétées	
Source of Variation	P value summary
Interaction	****
Time	*
Group	***
Subjects (matching)	*

Tableau 18 : ANOVA à mesures répétées sur gain de masse (fig. 32)

Gain de masse		CON			HF			HF-T63-FULL			HF-T63-ON/OFF		
		0 à 7	7 à 10	10 à 13	0 à 7	7 à 10	10 à 13	0 à 7	7 à 10	10 à 13	0 à 7	7 à 10	10 à 13
CON	0 à 7		NS	NS	NS			NS			NS		
	7 à 10			NS		*			NS			NS	
	10 à 13						NS			NS			NS
HF	0 à 7					NS	NS	**			****		
	7 à 10						NS		*			****	
	10 à 13									NS			****
HF-T63-FULL	0 à 7								NS	NS	NS		
	7 à 10									NS		****	
	10 à 13												**
HF-T63-ON/OFF	0 à 7											****	NS
	7 à 10												****
	10 à 13												

Tableau 19 : Post-hoc Tukey sur gain de masse (fig. 32)

ANOVA mesures répétées	
Source of Variation	P value summary
Interaction	***
Time	***
Group	****
Subjects (matching)	ns

Tableau 20 : ANOVA à mesures répétées sur gain de masse grasse

Gain de masse grasse		CON			HF			HF-T63-FULL			HF-T63-ON/OFF		
		0 à 7	7 à 10	10 à 13	0 à 7	7 à 10	10 à 13	0 à 7	7 à 10	10 à 13	0 à 7	7 à 10	10 à 13
CON	0 à 7		NS	NS	*			NS			NS		
	7 à 10			NS		***			NS			***	
	10 à 13						NS			NS			NS
HF	0 à 7					NS	NS	**			**		
	7 à 10						NS		**			NS	
	10 à 13									NS			***
HF-T63-FULL	0 à 7								NS	NS	NS		
	7 à 10									NS		***	
	10 à 13												*
HF-T63-ON/OFF	0 à 7											****	NS
	7 à 10												****
	10 à 13												

Tableau 21 : Post-hoc de Tukey sur gain de masse grasse

11.3. DOSAGES DE PROTEINES TOTALES FIGURE 30

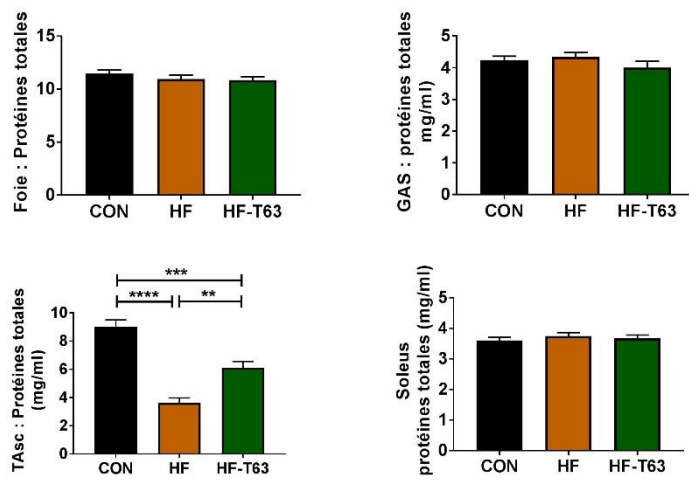


Figure 38 : Dosage de protéines totales pour WB, complément Figure 30

ANOVA à 1 voie suivie d'un test post-hoc de Tukey, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN Effects of high-intensity interval training and moderate-intensity continuous training on glycaemic control and skeletal muscle mitochondrial function in db/db mice

Received: 10 January 2017
Accepted: 15 February 2017
Published online: 16 March 2017

Vivien Chavanelle^{1,2}, Nathalie Boisseau¹, Yolanda F Otero¹, Lydie Combaret³, Dominique Dardevet³, Christophe Montaurier¹, Geoffrey Delcros², Sébastien L Peltier² & Pascal Sirvent¹

Physical activity is known as an effective strategy for prevention and treatment of Type 2 Diabetes. The aim of this work was to compare the effects of a traditional Moderate Intensity Continuous Training (MICT) with a High Intensity Interval Training (HIIT) on glucose metabolism and mitochondrial function in diabetic mice. Diabetic db/db male mice (N = 25) aged 6 weeks were subdivided into MICT, HIIT or control (CON) group. Animals in the training groups ran on a treadmill 5 days/week during 10 weeks. MICT group ran for 80 min (0° slope) at 50–60% of maximal speed (Vmax) reached during an incremental test. HIIT group ran thirteen times 4 minutes (20° slope) at 85–90% of Vmax separated by 2-min-rest periods. HIIT lowered fasting glycaemia and HbA1c compared with CON group ($p < 0.05$). In all mitochondrial function markers assessed, no differences were noted between the three groups except for total amount of electron transport chain proteins, slightly increased in the HIIT group vs CON. Western blot analysis revealed a significant increase of muscle Glut4 content (about 2 fold) and higher insulin-stimulated Akt phosphorylation ratios in HIIT group. HIIT seems to improve glucose metabolism more efficiently than MICT in diabetic mice by mechanisms independent of mitochondrial adaptations.

Overall, physical activity appears as an effective strategy in both prevention and treatment of Type 2 Diabetes (T2D)¹. Numerous studies have shown improved insulin sensitivity, glucose tolerance and long term glucose control following exercise training interventions^{2–4}, and current guidelines from the major international scientific organizations regarding prescriptions of aerobic training in T2D now recommend 150 min of moderate to vigorous intensity exercise weekly⁵. Nevertheless, long-term adherence to physical activity in individuals with T2D is problematic⁶. Moreover, some studies have reported resistance to the beneficial effects of exercise in some individuals⁷. Therefore, identification of physical activity modalities displaying higher adherence and/or efficiency is a major challenge to improve health benefits in individuals with T2D.

It has been demonstrated that high-intensity interval training (HIIT) can improve patient adherence to physical activity^{8,9}, and numerous recent studies have also shown improvements in glycaemic control following HIIT^{10–19}. The effects of HIIT on blood glucose could be partly mediated by improved skeletal muscle mitochondrial function, as it has been suggested by some authors²⁰. HIIT seems indeed to be a strong activator of mitochondrial biogenesis and this effect could be mediated by stimulation of PGC1- α expression^{21–24}. Mitochondrial impairment has been linked to insulin resistance²⁵, and consequently, improvement of mitochondrial function may restore skeletal muscle insulin signalling²⁶. To date, no study has compared the effects of HIIT vs. the

¹Université Clermont Auvergne, Laboratoire des Adaptations Métaboliques à l'Exercice en conditions Physiologiques et Pathologiques (AME2P), Clermont-Ferrand, F-63000, France. ²Valbiotis S.A.S., La Rochelle, France. ³INRA, Unité de Nutrition Humaine (UNH, UMR 1019), CRNH Auvergne, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to V.C. (email: vivien.chavanelle@valbiotis.com)

	CON	MICT	HIIT	<i>p</i> (ANOVA)
N=	9	8	8	
Body mass week 10 (g)	39.89 ± 0.79	39.04 ± 1.43	35.19 ± 3.19	0.232
Fat mass week 1 (% b.w.)	47.46 ± 0.76	46.48 ± 0.74	48.96 ± 0.50	0.060
Fat mass week 10 (% b.w.)	52.96 ± 0.78	53.11 ± 0.75	48.14 ± 4.31	0.920
Lean mass week 1 (% b.w.)	49.66 ± 0.74	50.81 ± 0.97	48.67 ± 0.54	0.250
Lean mass week 10 (% b.w.)	44.91 ± 0.62	44.95 ± 0.66	50.27 ± 4.18	0.710
Liver mass (g)	1.70 ± 0.09	1.68 ± 0.07	1.48 ± 0.07	0.093
Liver mass (% b.w.)	4.27 ± 0.19	4.35 ± 0.25	4.54 ± 0.06	0.875
Gastroc mass (mg)	51.75 ± 2.80	51.50 ± 3.58	49.87 ± 4.28	0.920
Gastroc mass (% b.w.)	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.372
Liver TG (nmol/mg)	47.86 ± 1.68	47.65 ± 5.34	36.31 ± 4.93	0.118

Table 1. Mice characteristics before and after training.

traditional moderate-intensity continuous training (MICT) on skeletal muscle mitochondrial adaptations in a context of T2D.

Consequently, the aim of this work was to compare the effects of 10 weeks of HIIT and MICT on glycaemic profile, skeletal muscle insulin signalling and mitochondrial function in diabetic mice. We hypothesised that HIIT would lead to greater benefits on glycaemic control due to superior mitochondrial function improvements.

Results

Body composition and indirect calorimetry measurements. No significant effects of training were noted on body weight or fat and lean mass compared with CON (Table 1).

Glycaemia and response to starch and insulin tolerance tests. After 10 weeks of training, fasting plasma glucose was significantly lower in HIIT group ($18.0 \pm 3.0 \text{ mmol.l}^{-1}$) than in MICT group ($26.0 \pm 1.5 \text{ mmol.l}^{-1}$, $p < 0.05$) and CON group ($30.0 \pm 1.5 \text{ mmol.l}^{-1}$, $p < 0.01$) (Fig. 1a). In accordance with this result, HbA_{1c} level was also significantly reduced in HIIT group ($6.0 \pm 0.4\%$) compared with CON group ($7.5 \pm 0.3\%$, $p < 0.05$) (Fig. 1b). Fasting serum insulin levels were not different among the groups (Fig. 1c). Repeated measures ANOVA of ITT (Fig. 1d) and OSTT (Fig. 1e) revealed significant differences between groups at several time points. However, since AUC₀₋₃₀ (baseline-corrected) did not differ between groups (not shown), it is concluded that these differences merely reflect differences in fasting glucose levels.

Muscle oxidative metabolism. In *gastrocnemius*, western blot analysis of OXPHOS ETC revealed a modest but significant global increase of the total amount of ETC proteins for HIIT group vs MICT and CON groups ($p < 0.0001$, Fig. 2b). AMPK is known as an important mediator of mitochondrial adaptations to exercise training, mainly through regulation of PGC1- α ²⁷. We found here that p-AMPK Thr172/AMPK ratio was unaffected by exercise (Fig. 2c). OXPHOS ETC, AMPK and p-AMPK full-length blots are presented in Supplementary Figure S1. In accordance, no effects of exercise training were seen on mRNA levels of PGC1- α , or other known regulators of mitochondrial biogenesis (Tfam, PPAR- α , PPAR- γ , NRF-1; Fig. 2e). Similarly, protein levels of mitofusin-2 (MFN2), a marker of mitochondrial fusion that has been shown to be repressed in diabetic state and increased following exercise²⁸, were not modified by MICT or HIIT protocols (Fig. 2d). MFN2 full-length blots are presented in Supplementary Figure S1. In line with these results regarding mRNA and protein levels of known regulators of mitochondrial function, we did not find any modification in CS and β -HAD activities caused by exercise training (Fig. 3c and d). We also measured leak state (V_{leak}) and maximal respiration (V_{max}) of *gastrocnemius* permeabilised fibres during a SUIF protocol corrected for ROX and instrumental background. No differences were seen between groups regarding maximum steady state O₂ flux after sequential addition of

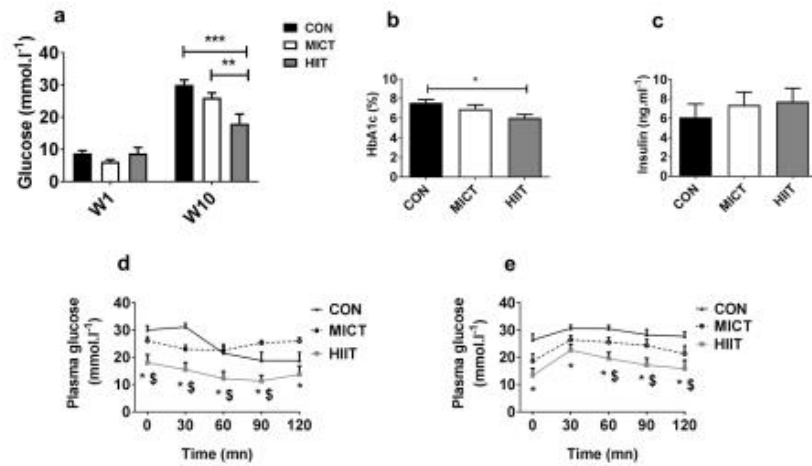


Figure 1. Effects of 10 weeks of MICT or HIIT on fasting blood glucose (a), glycosylated haemoglobin (b), fasting serum insulin (c) and blood glucose response to ITT (d,f) and OSTT (e,g). Data are expressed as means \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *Significantly different from CON; \$Significantly different from MICT.

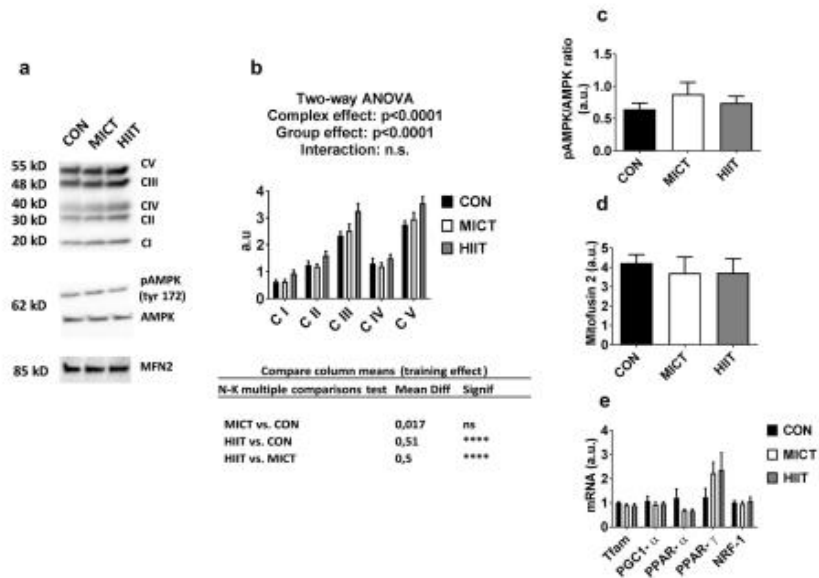


Figure 2. (a) Western blot representative images. The blots were cropped and full length blots are presented in Supplementary Figure S1. (b) ETC protein content assessed by western blot. (c) p-AMPK α Thr172/total-AMPK ratio. (d) Mitofusin levels assessed by western blot. (e) mRNA expression of mitochondrial biogenesis marker genes. Data are expressed as means \pm SEM. **** $p < 0.0001$.

palmitoylcarnitine and malate (V_0 PalC-M), ADP (V_{max} PalC-M), pyruvate (V_{max} PalC-PM), succinate (V_{max} PalC-PMS) and CCCP (ETS) (Fig. 3b).

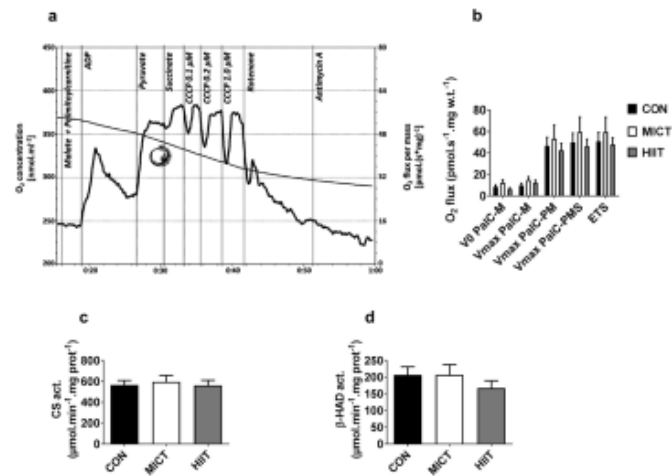


Figure 3. Oxygen concentration and mass-specific oxygen flux as a function of time were recorded in a SUIT protocol with permeabilised gastrocnemius. 0.02 mM palmitoyl-carnitine (Pal-C) and 2 mM malate were added in the chambers before the fibres were added. (ADP: 2.5 mM adenosine diphosphate; P: 5 mM pyruvate; S: 10 mM succinate; U: Carbonyl cyanide m-chloro phenyl hydrazine (CCCP); Rot: 0.5 μ M; AmA: 2.5 μ M Antimycin A). (a) Representative measurement of mitochondrial respiration. (b) Effects of MICT and HIIT on mitochondrial respiration. (c) Citrate synthase and (d) β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activities. Data are expressed as means \pm SEM.

Insulin signalling and Glut4 levels in skeletal muscle. *Ex vivo* basal and insulin-stimulated phosphorylation of Akt on Ser473 and Thr308 were investigated in paired *soleus* muscles incubated in presence or absence of 12 nM insulin. ANOVA showed a significant effect of exercise training ($p < 0.05$), and a significant interaction (exercise*insulin, $p < 0.05$). Post-hoc analysis revealed a higher insulin-stimulated Akt phosphorylation state in HIIT compared with MICT ($p < 0.05$) and CON ($p < 0.05$) (Fig. 4a). Glut4 content was significantly higher in HIIT group when compared with CON in *gastrocnemius* (about 2.5 fold, $p < 0.01$) and *soleus* (about 2 fold, $p < 0.05$) (Fig. 4b and c). *Soleus* Glut4 content was also increased in HIIT compared with MICT group (Fig. 4c, $p < 0.05$). All full-length blots are presented in Supplementary Figure S2.

Discussion

The results of the present study lead to confirm the hypothesis that HIIT improves glucose metabolism in a superior manner than MICT. We did not observe major changes in the mitochondria in any of the trained groups, suggesting that mitochondrial adaptations were not involved in such effect. Skeletal muscle insulin signalling and Glut4 content were only improved in the HIIT group, suggesting that skeletal muscle insulin sensitivity would be more altered by the effects of HIIT than by those of MICT. This could account for the better improvement of glucose homeostasis following HIIT intervention.

We chose in this work to compare the effects of two exercise training modalities in db/db mice. These animals quickly exhibit massive obesity and develop diabetes because of a mutation in the leptin receptor gene²⁹. In fact, there is no “perfect” model to study T2D. This pathology is very complex, because of the multiplicity of its genetic and environmental determinants³⁰. Therefore, although this db/db monogenic model of diabetes is naturally not representative of all forms of the disease, this animal model is among the most often utilised and widely accepted for treatment testing in diabetes research³¹. Leptin resistance is a common feature of obesity-related T2D³², and db/db mice represent an interesting model sharing most of metabolic abnormalities observed in human subjects³¹. Moreover, it has already been demonstrated that mitochondrial adaptations to exercise may be inhibited in the absence of leptin³¹. In this context, one could hypothesize that mitochondrial adaptations to exercise in the skeletal muscle might be difficult to obtain in db/db mice. Similarly, it has been shown that diabetic patients qualified of “exercise resistant” (e.g. failing to improve HbA1c in response to an exercise training program) display a concomitant incapacity to stimulate mitochondrial biogenesis^{7,34}. The db/db mouse therefore appears as a good model to study the efficiency of exercise training in a “difficult” context, well representative of “exercise resistant” diabetic patients. However, it would still be interesting to reproduce this protocol in different T2D models without monogenic cause.

We observed lower fasting glycaemia confirmed by lower HbA1c in HIIT group despite the absence of effect on body composition, whereas no improvements were noted in MICT group. To our knowledge, this study was the first to compare HIIT vs MICT in a context of T2D. An overview of the present literature testifies to the difficulty to obtain beneficial changes induced by physical activity in db/db mice. Two research teams have tested

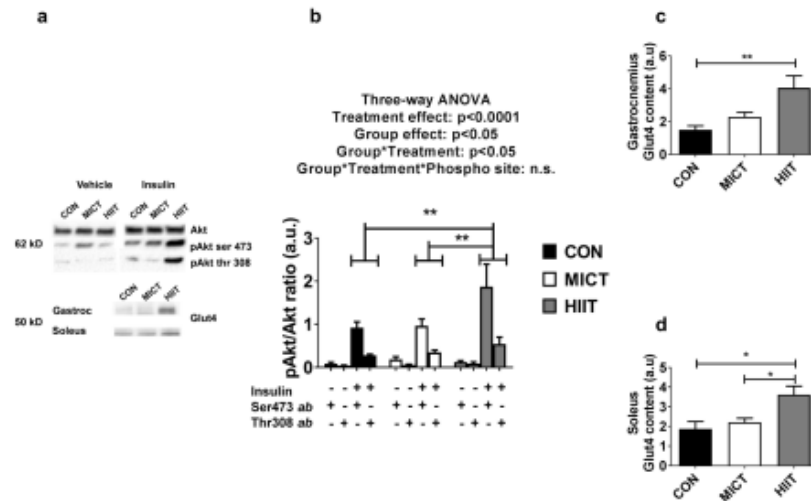


Figure 4. (a) Western Blot representative images. The blots were cropped and full length blots are presented in Supplementary Figure S2. (b) In soleus, phosphorylation ratios of insulin-stimulated Akt ser473/total-Akt and Akt thr 308/total-Akt. Gastrocnemius (c) and soleus (d) Glut4 content assessed by western blot. Data are expressed as means \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

HIIT in this model with a similar protocol. Ostler *et al.* showed modest improvements in glucose tolerance and basal Akt Ser473 phosphorylation³⁵. Stølen *et al.* noted an improvement in lipid profile³⁶. However, none of these teams showed lower fasting glucose. Among authors having tested more traditional continuous endurance exercise on db/db mice, Lee *et al.* showed improvements on insulin tolerance^{37,38} with no changes on fasting glucose, using a comparable MICT protocol as ours. Other studies on this model have failed to improve glycaemic control with such a protocol^{39–41}. Therefore, our study confirms that exercise-training adaptations regarding glucose homeostasis are difficult to obtain in db/db mice, reinforcing the idea that these animals could be used as an “exercise resistance” model. Interestingly, positive effects of HIIT on glucose homeostasis were found in this context. These results strengthen the interest to study the effects of HIIT in diabetic context and highlight this exercise modality as a candidate to overpass the exercise-resistant state.

Few changes occurred following 10 weeks of HIIT in skeletal muscle mitochondrial parameters. We solely noted an increase in the total amount of ETC proteins, with no incidence on functional oxidative capacity assessed through *ex vivo* permeabilised fibres respiration. Accordingly, CS and β -HAD activities, like mRNA expression of genes related to mitochondrial biogenesis, were also left unaffected by HIIT or MICT. In wild-type mice, chronic exercise is a well-known activator of AMPK, which in turn triggers mitochondrial biogenic response through PGC1- α induction⁴². This mechanism has also been confirmed in humans⁴³. These new data show that this mutant model of T2D mice did not respond to stimulatory effects of chronic exercise in any of these parameters, suggesting that some step of the signalling pathway might be defective. As it has already been suggested in experiments using ob/ob mice, intact leptin signalling might be necessary for exercise-induced adaptation through AMPK and PGC1- α in muscle^{33,35}, this could therefore explain the nearly absence of mitochondrial adaptation consecutive to exercise training in this work. These results obtained with db/db mice are also consistent with some observations made in humans. Indeed, it has also been demonstrated that the chronic exercise-induced rise in PGC1- α and Mfn2 is sometimes abolished in young type 2 diabetic subjects⁴⁵. It is important to specify that all the experiments performed on skeletal muscle in the present study have been realised in tissues harvested 72 h after the last exercise session, to avoid the potential confounding effects of acute exercise⁴⁴. Therefore, we cannot rule out the possibility that transient elevation of AMPK activation and PGC1- α induction may have occurred following each training session. Such effect could explain the slight increase in the amount of ETC proteins following HIIT. Nevertheless, the fact that mitochondrial respiration measurements did not exhibit any improvement in the trained groups rather indicates minor or absent functional adaptations of mitochondria following chronic exercise. Overall, these results do not argue the involvement of mitochondrial adaptations in the beneficial effects of HIIT on glycaemic control.

Although it is believed that mitochondrial adaptations may mediate part of the beneficial effects of physical activity in the case of T2D³⁰, the present study suggests that non-mitochondrial-dependent mechanisms could also be involved to explain the improvements in glycaemic control after HIIT intervention. We found a significant increase for insulin-stimulated Akt phosphorylation at Ser473 and Thr308 in HIIT group vs CON. Interestingly, decreased Akt phosphorylation at one or the other of those sites is a hallmark of skeletal muscle insulin signalling defect in T2D^{45,46}. Therefore, an improvement in this parameter might reflect lower insulin resistance and might

partly explain the positive effects of HIIT on fasting blood glucose concentration. Moreover, Glut4 content in *soleus* and *gastrocnemius* was significantly increased in HIIT group vs. CON and interestingly, Glut4 seems to be largely involved in whole body glucose homeostasis. Several studies using muscle-specific Glut4 KO mice have shown that Glut4 disruption can lead to hyperglycaemia⁴⁵ or impaired glucose tolerance in high fat or chow-fed mice^{48,49}. Likewise, studies dealing with the effect of a single exercise session on Glut4-deficient mice, all converge upon the conclusion that Glut4 is the major factor responsible for exercise-induced glucose uptake^{50–52}. Reciprocally, overexpression of Glut4 in both lean and diabetic db/db mice improved both fasted and fed glycaemia, insulin action, and enhanced disposal of an oral glucose challenge^{53–56}. Interestingly, during acute exercise, mice overexpressing Glut4 seem to preferably utilise carbohydrates over lipids as a fuel source, so that there is no change in overall energy expenditure⁵⁷. However this statement was challenged by a more recent study using 2-Deoxy-[3H]glucose, which showed no differences between wild type and transgenic mice in muscle glucose uptake during exercise⁵⁸, suggesting that a normal Glut4 content is sufficient for increased glucose uptake in the muscle, during exercise. In another study, Ikemoto *et al.* demonstrated that chronic exercise resulted in increased Glut4 protein expression in both control and transgenic mice overexpressing Glut4. The authors showed a concomitant and cumulative improvement in glycaemic control associated with the enhanced Glut4 content, whether be from transgenic manipulation, physical training or both⁵⁹. Therefore, in the present study, the increase in muscle Glut4 content induced by HIIT is therefore likely to be partly responsible for the improved ability for muscle to uptake blood glucose.

The explanation of the higher benefits of HIIT over MICT regarding improvement of insulin signalling and Glut4 content in skeletal muscle remains unknown. A recent study in healthy and obese mice has evaluated the impact of exercise intensity on the physiological adaptations to exercise training program⁶⁰. This study showed that higher exercise intensity allowed better improvement of skeletal muscle Glut4 content and glycaemic control in obese animals. Furthermore, some signalling pathways seem particularly sensitive to exercise intensity. For example, Egan *et al.* have shown in human skeletal muscle that phosphorylation of HDAC, a well-known activator of Glut4 transcription⁶¹, was increased following a single bout of exercise at 80% of $\dot{V}O_{2peak}$ but not after a single bout of exercise at 40% of $\dot{V}O_{2peak}$. Further studies are needed to better understand the molecular mechanisms leading to higher benefits of HIIT over MICT regarding Glut4 and insulin signalling adaptations in db/db mice. Finally, it bears mentioning that exercise is an important stimulus for ATP turnover. In this study, although the duration of the exercise sessions was the same for MICT and HIIT, we were not technically able to assess energy expenditure during training. Thus, we cannot exclude that the higher energy output leading to higher ATP turnover during HIIT may also be a participating factor in the reduced fasting glucose in this group.

In summary, we showed that HIIT allowed a better improvement in glycaemic control than MICT in db/db mice. This effect was not associated with mitochondrial adaptations in the skeletal muscle. HIIT was the only exercise modality to improve skeletal muscle insulin signalling and Glut4 content. Overall, these experiments reinforce the interest of HIIT interventions in diabetic patients. In addition to the claim of better adherence for patients to this modality, HIIT may also exhibit higher beneficial effects on metabolic adaptations. Further studies are needed to confirm these effects and to elucidate the explanatory physiological mechanisms.

Methods

Animals. All methods were carried out in accordance with *the guide for the care and use of laboratory animals*, Eighth edition (2011). All procedures were approved by local ethic committee (CE2A-02, Auvergne, France). Male db/db (BKS(D)-Lepr^{db}/JOrlRj) aged 5 weeks were obtained from Janvier (JANVIER LABS, France), housed in individual cages with normal 12-h: 12-h light/dark cycles and fed a standard diet (A03 enriched with 3% corn oil, Safe, France). After 1 week of acclimatization, 30 mice out of 46 were selected for the study after a running test and the best runners were randomly divided into control group (CON), MICT and HIIT. After 10 weeks of training, animals were fasted overnight and killed by cervical dislocation before tissues were harvested.

Exercise performance test. The protocol was based on previous published works^{35,37,63} with the following adaptations: The mice from MICT group were placed on the treadmill and warmed up during 5 min at a speed of 6 m/min. Speed was then increased by steps of 2 m/min every 2 min until the mice was unable or unwilling to carry on despite mild stimulation with a wooden cane. Mice in the HIIT group performed an uphill performance test based on a similar protocol on a treadmill set on a 20° incline. Performance tests were carried out at the beginning and after 5 weeks of training in order to re-adjust training intensity.

Exercise training. Chronic exercise protocols were adapted from previous works^{35–37}, with the following modifications: mice in the MICT group ran for 80 min at an intensity of 50–60% (0% slope) of the maximum speed reached during the last exercise performance test. Mice in the HIIT group performed a high intensity interval uphill training which consisted of 13 series alternating between 4 minutes at an intensity corresponding to 85–90% (20° slope) of the maximum speed reached during the last uphill performance test and 2 minutes of rest. To allow for animal acclimatization, exercise intensity was gradually increased over the first 3 weeks at level (0°) or 20° incline in order to reach the objectives described above. Mice assigned to both exercise groups were exposed to 10 weeks of training consisting of treadmill running 5 days per week.

Body composition. Lean mass and fat mass were assessed with an EchoMRI 3-in-1 instrument (Echo Medical Systems, Houston, TX) at the beginning and at the end of the training protocol.

In vivo Oral Starch Tolerance Test (OSTT) and Insulin Tolerance Test (ITT). OSTT and ITT were performed *in vivo* at the end of the 10-week training period. Blood glucose was monitored in overnight fasted mice for two hours following an intraperitoneal injection of human insulin (ITT) or an oral gavage of corn starch solution (OSTT). Blood glucose was measured using Accu-Chek Performa (Roche, USA). For ITT, Neutral

Protamine Hagedorn Insulin (human NPH insulin) was diluted down to 0.2 U/ml and administered intraperitoneally (2 U/kg BW). For OSTT, the mice were submitted to an oral gavage of 3 g/kg BW of corn starch solution. Blood glucose was measured 30 min, 60 min, 90 min and 120 min after the intervention.

Whole blood and serum parameters. Whole blood was harvested right after the death of the mice and a small portion was collected in an EDTA-treated tube and put on ice until analysis. The rest of the blood was collected in a dry tube and allowed to clot at room temperature for 45 min before being centrifuged for 10 min at 2000 g. Serum was collected and frozen at -80°C until analysis. Serum insulin level was estimated using mouse ultrasensitive insulin ELISA kit provided by Alpco (Alpco Diagnostics, USA). Whole blood HbA1c level was assessed by enzymatic assay kit provided by Chrystal Chem (USA).

Muscle incubation. Intact *Soleus* muscles from both legs were dissected and incubated for 30 min in Krebs–Henselheit bicarbonate buffer (NaCl 120 mM, KCl 4.8 mM, NaHCO_3 25 mM, KH_2PO_4 1.2 mM and MgSO_4 1.2 mM, pH 7.4), supplemented with 5 mM HEPES, 5 mM glucose and 0.1% BSA⁶⁴. Gas phase in the medium was maintained at 95% O_2 –5% CO_2 . After 30 min of pre-incubation, muscles were transferred into a fresh medium of identical composition in absence or presence of 12 nM insulin and further incubated for 30 min. Samples were then immediately frozen into liquid nitrogen and stored at -80°C .

Mitochondrial enzymes activities. 25 mg of frozen tissue was extracted with a potter in 20 volumes of buffer (KCl 175 mM, EDTA 2 mM, and Triton 100 \times 0.1%, pH: 7.4), submitted to 3 freeze–thaw cycles and diluted 5 times in the same buffer. Citrate Synthase (CS) and β -Hydroxyacyl-CoA (β -HAD) activities were then determined according to the methods described by Stephenson *et al.*⁶⁵.

High resolution respirometry (HRR). HRR was performed in an Oxygraph-2k (Oroboros, Austria) according to the recommendations of previous authors⁶⁶. Briefly, a small amount of *gastrocnemius* muscle was excised and mechanically separated over ice for a standardised period of 4 min before being chemically permeabilised for 30 min in ice-cold BIOPS added with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ saponin. Tissues were washed with respiration medium (MiR05) before 1 to 3 mg of wet tissue was transferred in a chamber containing 2 ml MiR05 + 20 mM creatine monohydrate. Individual chambers were oxygenated to 450 $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ with pure O_2 and calibrated before muscles fibres were added.

Substrate uncoupler inhibitor titration (SUIT) protocol. Palmitoyl-carnitine (0.02 mM) and malate (2 mM) were added to the chambers and the oxygen signal was allowed to stabilise for 5 to 10 min. *Gastrocnemius* fibres were added and leak state was recorded. ADP (2.5 mM) along with MgCl_2 (1.5 mM) was then added into the chambers for fatty-acid stimulated OXPHOS measurement. The rest of SUIT protocol consisted of the sequential recording of plateau O_2 consumption for complex I (addition of pyruvate 5 mM), complex I + II (addition of succinate 10 mM), complex II (addition of 0.5 μM rotenone), uncoupled complex II (addition of steps of 0.05 μM Carbonyl cyanide *m*-chloro phenyl hydrazine (CCCP) until maximal O_2 consumption is reached). Residual oxygen consumption (ROX) was then evaluated after the addition of 2.5 μM antimycin. Temperature was maintained at $+37^{\circ}\text{C}$ and the medium was reoxygenated whenever the O_2 level dropped under 250 μM ⁶⁶. Mass-specific O_2 flux was determined using DatLab V.6 (Oroboros, Austria) from steady-state O_2 flux normalised to tissue wet weight and adjusted for instrumental background.

Blotting. 50 mg of frozen tissue was added to 20 volumes of NP-40 buffer (Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, NaF 1 mM, Na_2VO_4 1 mM, Nonidet P-40 1%, Sodium deoxycholate 0.25%, pH: 7.4) supplemented with freshly added protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma Aldrich) and phosphatase inhibitor tablets (#88667 Thermo Fisher Scientific, USA). The tissues were homogenised on ice using a glass potter before samples were centrifuged at 14000 g for 10 min ($+4^{\circ}\text{C}$) and the supernatant was collected. The protein content of the supernatant was determined using a commercial DC protein assay (Bio-Rad, USA) and all samples were subsequently diluted to a standard concentration and diluted with 2X Laemmli buffer.

Blotting was performed as described by Ennequin *et al.*⁶⁷, with the following specificities: membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against AMPK α (D63G4), p-AMPK α Thr172 (40H9), Akt (pan C67E7), p-Akt thr308 (C31E5E), p-Akt ser473 (D9E), all at concentration of 1:1000, purchased from Cell Signaling (USA), Glut4 (IF8) at concentration of 1/200 purchased from Santa Cruz Biotechnology (USA), MFN-2 (NIAR164) at concentration of 1:2000 and OXPHOS Electron Transfer Chain proteins (ETC) at concentration of 1:1000 purchased from Abcam (USA). After incubation, the membranes were washed with TTBS and exposed to appropriate dilutions of anti-species horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature. Membranes were then washed 3 times in TTBS before being exposed to an enhanced chemiluminescent solution (Clarity Western ECL; Bio-Rad, USA) for 1 min. Membranes were exposed using a Bio-Rad ChemiDoc system, and band densities were determined using image-analysis software (Image Lab V5.0, Bio-Rad, USA). Stain Free[®] (Bio-Rad, USA) blot image was used as total protein loading control and data was normalised accordingly⁶⁸.

Quantitative Real-Time PCR. Total RNA was extracted from *gastrocnemius* tissue using TRIzol[®] (Invitrogen, Life Technologies). cDNA was synthesised from 2 μg RNA with the High Capacity cDNA transcription kit (Applied Biosystems, Life Technologies). PCR amplification was carried out using the CFX Bio-Rad system with Taqman probes sets (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) and the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method was used to quantify mRNA levels. Gene expression was normalised using *Gapdh* as a housekeeping gene. Data are represented using the Rq which is normalised to the control group or $\text{Rq} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ [$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{target}) - \text{Ct}(\text{Gapdh})$; $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{sample}) - \Delta\text{Ct}(\text{control})$].

Statistical analysis. Results are shown as the mean \pm SEM. Normality was verified using Kolmogorov-Smirnov's test. Homogeneity of variance was assessed using Bartlett F test. When both conditions of normality and homogeneity of variance were respected, one-way, two-way, three-way or repeated measures ANOVA were run and a Student-Newman-Keuls post-hoc test was applied when ANOVA reached significance level ($p < 0.05$). When normality was not respected, a Kruskal-Wallis test was run instead of ANOVA. When homogeneity of variance was not respected, ANOVA was run with the Greenhouse-Geisser correction.

References

1. Sanz, C., Gautier, J. F. & Hanaire, H. Physical exercise for the prevention and treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Metab* **36**, 346–351 (2010).
2. Avery, L., Flynn, D., van Wersch, A., Sniehotta, F. F. & Trenell, M. I. Changing physical activity behavior in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of behavioral interventions. *Diabetes Care* **35**, 2681–2689 (2012).
3. Umpierre, D., Ribeiro, P. A., Schaun, B. D. & Ribeiro, J. P. Volume of supervised exercise training impacts glycaemic control in patients with type 2 diabetes: a systematic review with meta-regression analysis. *Diabetologia* **56**, 242–251 (2013).
4. Roberts, C. K., Little, J. P. & Thyfault, J. P. Modification of insulin sensitivity and glycemic control by activity and exercise. *Med Sci Sports Exerc* **45**, 1868–1877 (2013).
5. American Diabetes Association. Physical Activity/Exercise and Diabetes. *Diabetes Care* **27**, s58–s62 (2004).
6. Chen, Y., Sloan, F. A. & Yashkin, A. P. Adherence to diabetes guidelines for screening, physical activity and medication and onset of complications and death. *J Diabetes Complications* **29**, 1228–1233 (2015).
7. Stephens, N. A. & Sparks, L. M. Resistance to the beneficial effects of exercise in type 2 diabetes: are some individuals programmed to fail? *J Clin Endocrinol Metab* **100**, 43–52 (2015).
8. Kong, Z. et al. Comparison of High-Intensity Interval Training and Moderate-to-Vigorous Continuous Training for Cardiometabolic Health and Exercise Enjoyment in Obese Young Women: A Randomized Controlled Trial. *PLoS One* **11**, e0158589 (2016).
9. Jung, M. E., Bourne, J. E., Beauchamp, M. R., Robinson, E. & Little, J. P. High-intensity interval training as an efficacious alternative to moderate-intensity continuous training for adults with prediabetes. *J Diabetes Res* **2015**, 191595 (2015).
10. Francois, M. E. & Little, J. P. Effectiveness and safety of high-intensity interval training in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Spectr* **28**, 39–44 (2015).
11. Cassidy, S. et al. High intensity intermittent exercise improves cardiac structure and function and reduces liver fat in patients with type 2 diabetes: a randomised controlled trial. *Diabetologia* **59**, 56–66 (2016).
12. Denou, E., Marcinko, K., Surette, M. G., Steinberg, G. R. & Schertzer, J. D. High-intensity exercise training increases the diversity and metabolic capacity of the mouse distal gut microbiota during diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **310**, E982–993 (2016).
13. Marcinko, K. et al. High intensity interval training improves liver and adipose tissue insulin sensitivity. *Mol Metab* **4**, 903–915 (2015).
14. Madsen, S. M., Thorup, A. C., Overgaard, K. & Jeppesen, P. B. High Intensity Interval Training Improves Glycaemic Control and Pancreatic beta Cell Function of Type 2 Diabetes Patients. *PLoS One* **10**, e0133286 (2015).
15. Fex, A., Leduc-Gaudet, J. P., Filion, M. E., Karelis, A. D. & Aubertin-Leheudre, M. Effect of Elliptical High Intensity Interval Training on Metabolic Risk Factor in Pre- and Type 2 Diabetes Patients: A Pilot Study. *J Phys Act Health* **12**, 942–946 (2015).
16. Shaban, N., Kenno, K. A. & Milne, K. J. The effects of a 2 week modified high intensity interval training program on the homeostatic model of insulin resistance (HOMA-IR) in adults with type 2 diabetes. *J Sports Med Phys Fitness* **54**, 203–209 (2014).
17. Gillen, J. B. et al. Acute high-intensity interval exercise reduces the postprandial glucose response and prevalence of hyperglycaemia in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* **14**, 575–577 (2012).
18. Trapp, E. G., Chisholm, D. J., Freund, J. & Boutcher, S. H. The effects of high-intensity intermittent exercise training on fat loss and fasting insulin levels of young women. *Int J Obes (Lond)* **32**, 684–691 (2008).
19. Steckling, F. M. et al. High Intensity Interval Training Reduces the Levels of Serum Inflammatory Cytokine in Women with Metabolic Syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* (2016).
20. Little, J. P. et al. Low-volume high-intensity interval training reduces hyperglycemia and increases muscle mitochondrial capacity in patients with type 2 diabetes. *J Appl Physiol* (1985) **111**, 1554–1560 (2011).
21. Cochran, A. J. et al. Intermittent and continuous high-intensity exercise training induce similar acute but different chronic muscle adaptations. *Exp Physiol* **99**, 782–791 (2014).
22. Gibala, M. J., Little, J. P., Macdonald, M. J. & Hawley, J. A. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. *J Physiol* **590**, 1077–1084 (2012).
23. Little, J. P., Safdar, A., Bishop, D., Tarnopolsky, M. A. & Gibala, M. J. An acute bout of high-intensity interval training increases the nuclear abundance of PGC-1 α and activates mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **300**, R1303–1310 (2011).
24. Hoshino, D., Yoshida, Y., Kitaoka, Y., Hatta, H. & Bonen, A. High-intensity interval training increases intrinsic rates of mitochondrial fatty acid oxidation in rat red and white skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* **38**, 326–333 (2013).
25. Szendroedi, J., Phielix, E. & Roden, M. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* **8**, 92–103 (2011).
26. Hesselink, M. K., Schrauwen-Hinderling, V. & Schrauwen, P. Skeletal muscle mitochondria as a target to prevent or treat type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* **12**, 633–645 (2016).
27. Marcinko, K. & Steinberg, G. R. The role of AMPK in controlling metabolism and mitochondrial biogenesis during exercise. *Exp Physiol* **99**, 1581–1585 (2014).
28. Zorzano, A. Regulation of mitofusin-2 expression in skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* **34**, 433–439 (2009).
29. Boquist, L., Hellman, B., Lernmark, A. & Taljedal, I. B. Influence of the mutation “diabetes” on insulin release and islet morphology in mice of different genetic backgrounds. *J Cell Biol* **62**, 77–89 (1974).
30. Jin, W. & Patti, M. E. Genetic determinants and molecular pathways in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)* **116**, 99–111 (2009).
31. Leiter, E. H. Selecting the “right” mouse model for metabolic syndrome and type 2 diabetes research. *Methods Mol Biol* **560**, 1–17 (2009).
32. Ceddia, R. B., Koistinen, H. A., Zierath, J. R. & Sweeney, G. Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *FASEB J* **16**, 1163–1176 (2002).
33. Li, L. et al. Mitochondrial biogenesis and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 α (PGC-1 α) deacetylation by physical activity: intact adipocytokine signaling is required. *Diabetes* **60**, 157–167 (2011).
34. Stephens, N. A. et al. A transcriptional signature of “exercise resistance” in skeletal muscle of individuals with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* **64**, 999–1004 (2015).
35. Ostler, J. E. et al. Effects of insulin resistance on skeletal muscle growth and exercise capacity in type 2 diabetic mouse models. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **306**, E592–605 (2014).
36. Stølen, T. O. et al. Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca²⁺ control, and SR Ca²⁺ release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy. *Circ Res* **105**, 527–536 (2009).

37. Lee, S., Park, Y., Dellsperger, K. C. & Zhang, C. Exercise training improves endothelial function via adiponectin-dependent and independent pathways in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**, H306–314 (2011).
38. Lee, S., Park, Y. & Zhang, C. Exercise Training Prevents Coronary Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetic Mice. *Am J Biomed Sci* **3**, 241–252 (2011).
39. Trask, A. J., Delbin, M. A., Katz, P. S., Zanesco, A. & Lucchesia, P. A. Differential coronary resistance microvessel remodeling between type 1 and type 2 diabetic mice: impact of exercise training. *Vascular Pharmacol* **57**, 187–193 (2012).
40. Broderick, T. L., Parrott, C. R., Wang, D., Jankowski, M. & Gutkowska, J. Expression of cardiac GATA4 and downstream genes after exercise training in the db/db mouse. *Pathophysiology* **19**, 193–203 (2012).
41. Sennott, J., Morrissey, J., Standley, P. R. & Broderick, T. L. Treadmill exercise training fails to reverse defects in glucose, insulin and muscle GLUT4 content in the db/db mouse model of diabetes. *Pathophysiology* **15**, 173–179 (2008).
42. Lee-Young, R. S., Canny, B. J., Myers, D. E. & McConnell, G. K. AMPK activation is fiber type specific in human skeletal muscle: effects of exercise and short-term exercise training. *J Appl Physiol* (1985) **107**, 283–289 (2009).
43. Hernandez-Alvarez, M. I. et al. Subjects with early-onset type 2 diabetes show defective activation of the skeletal muscle PGC-1 α /Mitofusin-2 regulatory pathway in response to physical activity. *Diabetes Care* **33**, 645–651 (2010).
44. Siu, P. M., Donley, D. A., Bryner, R. W. & Alway, S. E. Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. *Journal of Applied Physiology* **94**, 555–560 (2003).
45. Karlsson, H. K. R. et al. Insulin-Stimulated Phosphorylation of the Akt Substrate AS160 Is Impaired in Skeletal Muscle of Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes* **54**, 1692–1697 (2005).
46. Morino, K. et al. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest* **115**, 3587–3593 (2005).
47. Zisman, A. et al. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med* **6**, 924–928 (2000).
48. Kim, J. K. et al. Glucose toxicity and the development of diabetes in mice with muscle-specific inactivation of GLUT4. *J Clin Invest* **108**, 153–160 (2001).
49. Fam, B. C. et al. Normal muscle glucose uptake in mice deficient in muscle GLUT4. *J Endocrinol* **214**, 313–327 (2012).
50. Howlett, K. F., Andrikopoulos, S., Proietto, J. & Hargreaves, M. Exercise-induced muscle glucose uptake in mice with graded, muscle-specific GLUT-4 deletion. *Physiol Rep* **1**, e00065 (2013).
51. Zierath, J. R. et al. Restoration of hypoxia-stimulated glucose uptake in GLUT4-deficient muscles by muscle-specific GLUT4 transgenic complementation. *J Biol Chem* **273**, 20910–20915 (1998).
52. Ryder, J. W. et al. Postexercise glucose uptake and glycogen synthesis in skeletal muscle from GLUT4-deficient mice. *The FASEB Journal* **13**, 2246–2256 (1999).
53. Gibbs, E. M. et al. Glycemic improvement in diabetic db/db mice by overexpression of the human insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4). *Journal of Clinical Investigation* **95**, 1512–1518 (1995).
54. Brozinick, J. T. et al. GLUT4 Overexpression in db/db Mice Dose-Dependently Ameliorates Diabetes But Is Not a Lifelong Cure. *Diabetes* **50**, 593–600 (2001).
55. Leturque, A., Loizeau, M., Vaulont, S., Salminen, M. & Girard, J. Improvement of insulin action in diabetic transgenic mice selectively overexpressing GLUT4 in skeletal muscle. *Diabetes* **45**, 23–27 (1996).
56. Ren, J. M. et al. Overexpression of Glut4 protein in muscle increases basal and insulin-stimulated whole body glucose disposal in conscious mice. *J Clin Invest* **95**, 429–432 (1995).
57. Bao, S. & Garvey, W. T. Exercise in transgenic mice overexpressing GLUT4 glucose transporters: effects on substrate metabolism and glycogen regulation. *Metabolism* **46**, 1349–1357 (1997).
58. Fueger, P. T., Bracy, D. P., Malabanan, C. M., Pencsek, R. R. & Wasserman, D. H. Distributed control of glucose uptake by working muscles of conscious mice: roles of transport and phosphorylation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**, E77–84 (2004).
59. Ikemoto, S., Thompson, K. S., Itakura, H., Lane, M. D. & Ezaki, O. Expression of an insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) minigene in transgenic mice: effect of exercise and role in glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 865–869 (1995).
60. Cunha, V. N. et al. Role of exercise intensity on GLUT4 content, aerobic fitness and fasting plasma glucose in type 2 diabetic mice. *Cell Biochemistry and Function* **33**, 435–442 (2015).
61. McGee, S. L. & Hargreaves, M. Histone modifications and exercise adaptations. *J Appl Physiol* (1985) **110**, 258–263 (2011).
62. Egan, B. et al. Exercise intensity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 mRNA abundance is associated with differential activation of upstream signalling kinases in human skeletal muscle. *J Physiol* **588**, 1779–1790 (2010).
63. Kemi, O. J., Loennechen, J. P., Wisloff, U. & Ellingsen, O. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* (1985) **93**, 1301–1309 (2002).
64. Dardevet, D., Sornet, C., Balage, M. & Grizard, J. Stimulation of *in vitro* rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. *J Nutr* **130**, 2630–2635 (2000).
65. Stephenson, E. J. et al. Skeletal muscle respiratory capacity is enhanced in rats consuming an obesogenic Western diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **302**, E1541–1549 (2012).
66. Pesta, D. & Gnaiger, E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol Biol* **810**, 25–58 (2012).
67. Ennequin, G. et al. Exercise training and return to a well-balanced diet activate the neuregulin 1/ErbB pathway in skeletal muscle of obese rats. *J Physiol* **593**, 2665–2677 (2015).
68. Gilda, J. E. & Gomes, A. V. Western blotting using in-gel protein labeling as a normalization control: stain-free technology. *Methods Mol Biol* **1295**, 381–391 (2015).

Acknowledgements

The authors wish to thank Mr Mehdi Djelloul-Mazouz and Mr Philippe Denis from INRA Unité de Nutrition Humaine (UNH, UMR 1019), CRNH Auvergne (France) for the care and the attention to the animals. We also thank Mrs Monique Etienne from AME2P Lab (Clermont-Ferrand, France) and Mrs Anne-Sophie Galvardon for their excellent assistance during the experiments.

Author Contributions

V.C. and P.S. designed the research. V.C., L.C., D.D., C.M. and G.D. performed the experiments. Y.F.O. and S.P. provided reagents and technical support. V.C., N.B., Y.F.O. and P.S. analysed the data and wrote the manuscript. All authors revised the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-00276-8

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Résumé :

Le diabète de type 2 (DT2) représente l'un des principaux défis de santé du XXI^{ème} siècle. En 2015, 415 millions de personnes dans le monde étaient touchées tandis que 318 millions de plus présentaient un prédiabète, un stade défini comme à haut risque de développer la pathologie, mais encore réversible. Les recommandations hygiéno-diététiques (activité physique et alimentation) constituent la première ligne d'intervention dans le cadre de la lutte contre l'apparition du diabète de type 2. L'objectif de cette thèse était d'évaluer l'effet de deux stratégies interventionnelles inscrites dans les mesures hygiéno-diététiques sur le développement du DT2. L'étude 1 visait à comparer l'effet de deux modalités d'exercice chronique (continu à intensité modérée vs. intermittent de haute intensité) sur le développement du DT2 de jeunes souris *db/db*. L'étude 2 s'attachait à mesurer les effets d'un mélange de 5 extraits de plantes (Composition brevetée *Totum-63*,) sur le développement du DT2 à partir de deux modèles du prédiabète : la jeune souris *db/db* et la souris rendue insulino-résistante suite à un régime riche en graisses. Dans la 1^{ère} étude, l'entraînement intermittent de haute intensité a amélioré le contrôle glycémique indépendamment d'une adaptation de la fonction mitochondriale via notamment une augmentation du contenu musculaire en Glut4. Dans notre seconde étude, *Totum-63* a entraîné une amélioration du contrôle glycémique et de la sensibilité à l'insuline dans nos deux modèles. Plusieurs mécanismes sur différents tissus impliqués dans la physiopathologie du DT2 ont été mis en évidence, suggérant une action pléiotrope de *Totum-63*. En conclusion, ces résultats soutiennent l'intérêt de ces deux approches non-médicamenteuses dans le cadre de la lutte contre le développement du DT2. L'étude de l'action de l'activité physique combinée à celle de *Totum-63*, présente un intérêt supplémentaire et constitue un prolongement possible des travaux de cette thèse.

Abstract:

Type 2 diabetes (T2D) represents one of the main challenges for the 21st century. In 2015, 415 million people in the world were diabetic and 318 million more showed signs of prediabetes, a condition defined by a high risk of developing T2D, though still reversible. Lifestyle recommendations (physical activity and diet) form the first line of intervention for T2D prevention. The objective of this thesis was to measure the effects of two lifestyle-based therapeutic strategies on T2D development. Study 1 aimed at comparing the effects of two chronic exercise modalities (moderate-intensity continuous training vs. high-intensity interval training) on the progression of T2D of young *db/db* mice. Study 2 was focused on assessing the effects of a blend of 5 plants (patented formula *Totum-63*) on the development of T2D of two murine models of prediabetes: young *db/db* mice and high-fat diet induced insulin resistance mice. In study 1, high-intensity interval training improved glycaemic control maybe through enhanced muscular Glut4 content despite no adaptation of mitochondrial function. In study 2, *Totum-63* supplementation improved glycaemic control and insulin sensitivity in both models of prediabetes. Several mechanisms in tissues involved in T2D physiopathology were unveiled, suggesting a pleiotropic action of *Totum-63*. In conclusion, this work supports the interest of these two lifestyle-based interventions for preventing T2D development. Future prospects include the study of the combined action of chronic exercise and *Totum-63*.