



**HAL**  
open science

# Effets de quatre semaines de complémentation en spiruline sur les fibres musculaires et leurs dommages chez des rats diabétiques

Élodie Bazureau

► **To cite this version:**

Élodie Bazureau. Effets de quatre semaines de complémentation en spiruline sur les fibres musculaires et leurs dommages chez des rats diabétiques. Sciences du Vivant [q-bio]. 2017. dumas-01564686

**HAL Id: dumas-01564686**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01564686>**

Submitted on 19 Jul 2017

**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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



UNIVERSITÉ RENNES 2

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Master 2 Mouvement Sport Santé (M2S)

# Effets de 4 semaines de complémentation en spiruline sur les fibres musculaires et leurs dommages chez des rats diabétiques

Mémoire présenté par :

**Bazureau Elodie**

Tutrice universitaire et professionnelle : Sophie Vincent

Année universitaire 2016-2017

## **Remerciements :**

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements à l'ensemble des personnes qui ont permis la réalisation de cette étude, qui m'ont orienté, aidé dans mes démarches, soutenus et m'ont permis de mener à bien ce projet :

Je souhaite remercier Mme **Sophie Vincent**, Maître de Conférences à l'Université de Rennes 2, pour son aide et son suivi lors de la conception de ce mémoire.

Je souhaite également remercier ***Cindy Méziat*** pour le suivi quotidien dans les expériences de biochimie au laboratoire et des réponses apportées, Julie André et Pauline Coste pour les réponses apportées et l'analyse de certains marqueurs.

Je remercie ma famille pour son soutien et ses encouragements tout au long de mon cursus.

## Tables des matières

	Pages
<b>Listes des tableaux, des figures et des graphiques</b>	5-6
<b>Abréviations</b>	6
<b>Introduction</b>	7-8
<b>REVUE DE LITTÉRATURE</b>	9-22
<b>Chapitre 1 : Diabète et dommages musculaires</b>	9-17
1- Diabète	9-10
2- Masse musculaire, taille des fibres, balance protéique et diabète	10-15
3- Dommages musculaires et diabète	15-16
4- Diabète et exercice aigu exhaustif à dominante excentrique ou inhabituel	16-17
<b>Chapitre 2 : Spiruline et ses effets sur les dommages musculaires</b>	17
1- Composition et propriétés de la spiruline	17-18
2- Spiruline, diabète, balance protéique et dommages musculaires	18-22
<b>SYNTHÈSE : Spiruline, le muscle (masse et dommage) et la récupération musculaire</b>	22
<b>OBJECTIFS</b>	23
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODE</b>	24-26
<b>Chapitre 1 : Design expérimental</b>	24-25
<b>Chapitre 2 : Sacrifices et prélèvements de tissu</b>	25
<b>Chapitre 3 : Analyses biochimiques et biologie moléculaires</b>	25-26
1- Analyse de l'expression des protéines par Western Blot	25
2- Analyse biochimique par spectrophotométrie	25-26
3- Analyse musculaire : surface de section et marqueurs par technique d'immunohistochimie	26
<b>Chapitre 4 : Études statistiques des résultats</b>	26
<b>RÉSULTATS</b>	26-32
<b>Chapitre 1 : Induction du diabète et validation du modèle diabétique</b>	26
<b>Chapitre 2 : Effets de la complémentation en spiruline et/ou de l'exercice aigu sur les dommages musculaires</b>	26-32
1- Effets de la spiruline et/ou de l'exercice sur la masse corporelle	27
2- Effets de la spiruline sur le temps de course	27
3- Effets de la spiruline et/ou de l'exercice sur la balance protéique, la masse musculaire et la surface de section des fibres musculaires	27-28
4- Effets de la spiruline et/ou de l'exercice sur la protéosynthèse et des éléments de voie de signalisation	28-29
5- Effets de la spiruline et/ou de l'exercice sur la protéolyse et son activation <i>via</i> la voie inflammatoire	29
6- Effets de la spiruline et/ou de l'exercice sur le statut pro et antioxydant	29-31
7- Effets de la spiruline et/ou de l'exercice sur les dommages musculaires et l'inflammation tissulaire	31-32
<b>DISCUSSION</b>	33-38
<b>Chapitre 1 : Validation du modèle diabétique</b>	33
<b>Chapitre 2 : Effets de la complémentation en spiruline sur la glycémie et le contrôle glycémique</b>	33

<b>Chapitre 3 : Effets de la complémentation en spiruline sur la masse corporelle, la balance protéique et les dommages oxydatifs, musculaires</b>	33-36
1- Effet de la spiruline sur la masse corporelle, la masse musculaire, la surface de section et les mécanismes	33-35
2- Effet de la spiruline sur les dommages oxydatifs et musculaires	35-36
<b>Chapitre 4 : Effets de l'exercice dommageable sur la balance protéique et les dommages oxydatifs, musculaires</b>	36
<b>Chapitre 5 : Effets de la complémentation en spiruline avec l'exercice dommageable sur la balance protéique et les dommages oxydatifs, musculaires</b>	37-38
<b>LIMITES ET PERSPECTIVES</b>	39-40
<b>CONCLUSION</b>	40
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	41-44
<b>ANNEXES</b>	45-52
<i>Résumer en français et en anglais</i>	53-54

## Listes des tableaux et des figures :

### **Tableaux :**

<b>Tableau 1</b>	Récapitulatif des protéines d'intérêt, de leur forme phosphorylée/totale
<b>Tableau 2</b>	Composition détaillée des paillettes de spiruline
<b>Tableau 3</b>	Détails et descriptifs des étapes de la technique d'immunohistochimie analysant les marqueurs iNOS, MPO, CD68 et CD163

### **Figures :**

<b>Figure 1</b>	Évolution de la concentration plasmatique d'insuline chez des rats sains avec ou sans traitement et diabétiques avec ou sans traitement (D'après Yang et al, 2014)
<b>Figure 2</b>	Domages induits par l'induction du diabète par STZ, Tiré de « Schematic diagram of the STZ induced pancreatic damage in diabetes and its protection by CUR » (D'après Rashid et al, 2015)
<b>Figure 3</b>	Voies de signalisation de l'atrophie musculaire et de l'insuline chez les diabétiques (Modifié d'après Perry et al, 2016)
<b>Figure 4</b>	Voies de signalisation de l'inflammation et de l'insuline dans les tissus musculaires chez les diabétiques (Modifié d'après Nicolau et al, 2016-Perry et al, 2016)
<b>Figure 5</b>	Stress oxydant : déséquilibre des espèces pro-oxydants et antioxydants (Modifié d'après Sies & Jones, 2007)
<b>Figure 6</b>	Les différentes sources de la production des espèces radicalaires
<b>Figure 7</b>	Composition et propriétés actives de la spiruline (Modifié d'après Thang Sang Vo et al, 2015 - Wang et al, 2007)
<b>Figure 8</b>	Implications des propriétés antioxydantes de la spiruline dans le stress oxydant chez les diabétiques (Modifiés d'après Haleng et al, 2007-Reimund, 2002-Chen & Kotani, 2016-Deng & Chow, 2010- Boumaza, 2009)
<b>Figure 9</b>	Rôle de la spiruline dans la limitation des dommages musculaires chez les diabétiques - Voies de signalisation (Modifiés d'après Perry et al, 2016-Deng & Chow, 2010-Chen & Kotani, 2016)
<b>Figure 10</b>	Relation entre spiruline, dommages musculaires, exercice et diabète
<b>Figure 11</b>	Présentation des différents groupes de rats diabétiques de l'étude
<b>Figure 12</b>	Étapes du Western Blot réalisées dans cette étude
<b>Figure 13</b>	Glycémie avant et après l'induction du diabète par STZ chez les rats
<b>Figure 14</b>	Évolution de la masse corporelle chez les rats diabétiques complémentés en spiruline et placebo
<b>Figure 15</b>	Prise alimentaire totale des rats diabétiques complémentés en spiruline et placebo
<b>Figure 16</b>	Prise alimentaire par jour des rats diabétiques complémentés en spiruline et placebo
<b>Figure 17</b>	Temps de course des rats diabétiques complémentés en spiruline et placebo lors de l'exercice aigu à composante excentrique
<b>Figure 18</b>	Concentration plasmatique de glucose des rats diabétiques complémentés en spiruline et placebo, avec ou sans exercice aigu
<b>Figure 19</b>	Concentration plasmatique de fructosamine des rats diabétiques complémentés en spiruline et placebo, avec ou sans exercice aigu
<b>Figure 20</b>	Mesure de l'atrophie musculaire dans les muscles soléaires, tibialis et EDL
<b>Figure 21</b>	Contenu protéique et activation de la protéine Akt dans les muscles soléaires des rats complémentés en spiruline et placebo, avec ou sans exercice aigu
<b>Figure 22</b>	Contenus protéiques des protéines NF-KB et FoXO 3a dans les muscles soléaires des rats complémentés en spiruline et placebo, avec ou sans exercice aigu
<b>Figure 23</b>	Statut martial, marqueurs de la peroxydation lipidique et dommages musculaires au niveau des muscles soléaires des rats complémentés en spiruline et placebo, avec ou sans exercice aigu
<b>Figure 24</b>	Marqueurs de dommages musculaires au niveau plasmatique chez des rats complémentés en spiruline et placebo, avec ou sans exercice aigu

<b>Figure 25</b>	Marqueurs des macrophages M1 (CD68) et M1 (CD163) dans les muscles soléaires chez des rats complémentés en spiruline et placebo, avec ou sans exercice aigu
<b>Figure 26</b>	Effets de 4 semaines de complémentation en spiruline au niveau des voies de protéosynthèse et de protéolyse chez des rats diabétiques

### Liste des abréviations et symboles :

$^{\circ}\text{LO}_2$ ou $\Delta\text{O}_2$	Oxygène singulet	IFN $\gamma$	Interferon gamma
4-HNE	4-hydroxy-2-nonenal	IGF1	Insulin-like growth factor-1
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	IKB	Inhibitor of kappa B (ou IKK)
AA	Acides Aminés	ILs	Interleukine
AAE	Acides Aminés Essentiels	IL1 $\beta$ (R)	Interleukine 1 bêta (Receptor)
AAEN	Acides Aminés Non Essentiels	IL6 (R)	Interleukine 6 (Receptor)
Akt	Phosphokinase B	iNOS	Oxyde nitrique synthase
AG	Acides Gras	IR	Insulino-résistance
AGNE	Acide Gras Non Estérifiés	IRS1/2	Insulin receptor substrate 1/2
AI	Anti-inflammatoire	isoP	Isopropanes
AO	Antioxydantes	LDH	Lactate DésHydrogénase
ARNm	Acide RiboNucléique messenger	LDL	Lipoprotéine de basse densité
AS160	Akt Substrate of 160 kDa	MDA	Malondialdéhyde
ASTX	Astaxanthine	MCP1	Monocyte Chimoattractant Protein 1
ARA	Acide ARachidonique	Mn	Manganèse
Ca <sup>2+</sup>	Calcium	Mo	Molybdène
CAT	Catalase	MPO	Myéloperoxydase
CD68	Cluster of differentiation 68	NAD(P)+	Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Phosphate) +
CD163	Cluster of differentiation 163	NAD(P)H	Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Phosphate) Hydrogen
Cer	Céramides	NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa B
CK	Créatine kinase	$^{\circ}\text{NO}$	Monoxyde d'azote
CML	Carboxyméthyllysine	NOX	NAD(P)H Oxydase
COX2	Cyclo-oxygénase 2	$^{\circ}\text{O}_2^-$	Anion superoxyde
C-PC	Phycocyanine C	$^{\circ}\text{OH}$	Hydroxyde
CRP	C-Reactive protein	OGT	Oligosaccharides à Galactose Terminal
Cu <sup>2+</sup>	Cuivre	PGE2	Prostaglandine 2
DAG	Diacylglycerol	PI3K	Phosphatidylinositol 3 kinase
DT1	Diabète de type 1	RL	Radicaux libres
DT2	Diabète de type 2	RO $^{\circ}$	Radical alcoyle
E3	Ubiquitine-ligase	ROO $^{\circ}$	Radical peroxyde
EDL	Extensor Digitorum Longus	TAG	Triacylglycérols
ERN	Espèces Réactives Dérivées de l'Azote	mTOR(C1)	Mammalian target of rapamycin 1
ERO	Espèces Réactives dérivées de l'Oxygène	MuRF1	Muscle RING Finger 1 ou TRIM63
ERON	Espèces Réactives dérivées de l'Oxygène et de l'Azote	TIB	Tibialis
Fe <sup>2+</sup>	Ion ferreux	TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
FoXO 1	Forkhead box O transcription factor 1	Se	Sélénium
FoXO 3a	Forkhead box O transcription factor 3a	SO	Stress oxydant
GLA	Acide gamma linoléique	SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
GLUTs	Transporteurs de glucose	SOD	Superoxyde dismutase
GLUT4	Transporteurs de glucose 4	SOL	Soléaire
GPx	Glutathion Peroxydase	STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
GSH	Glutathion réduit	STZ	Streptozotocine
HDL	Lipoprotéine de haute densité	VLDL	Lipoprotéine de très basse densité
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène	X	Xanthine
HO $^{\circ}$	Radical hydroxyle	XO	Xanthine Oxydase
HO-1	Hème oxydase 1	Zn	Zinc
HOCl	Acide hypochloreux		

## Introduction

D'après l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) en 2016, le diabète est un problème majeur de santé publique, qui touche 422 millions de personnes. En 2030, il pourrait devenir la 7<sup>ème</sup> cause de mortalité mondiale. Cette pathologie se définit comme un trouble du métabolisme de l'insuline et du glucose.

Nous distinguons deux types de diabète : le diabète de type 1 (DT1) et le diabète de type 2 (DT2, qui représente 90% des cas diabétiques). Le DT1 se caractérise par la destruction des cellules pancréatiques, puis une production insuffisante d'insuline (insulinopénie), ensuite une hyperglycémie chronique et une atrophie musculaire. Dans le DT2, la pathologie s'installe selon ces différentes phases : un développement du tissu adipeux, puis une altération de la sensibilité des tissus (foie, tissus adipeux et musculaires) à l'insuline (insulino-résistance) et une intolérance au glucose (glucotoxicité) et enfin une hyperglycémie chronique (Widmaier et al, 2009-Jerkovic et al, 2009-Kassab et al, 2003). Lorsque le DT2 persiste sur plusieurs années, il induit des complications périphériques (Musculaires) (Karen Geoffroy, 2005-Kassab et al, 2003). Ces complications métaboliques sont associées à l'installation d'un stress inflammatoire et un stress oxydant chronique systémique (Bernard Catherine et al, 2013). Au niveau musculaire, ces altérations engendrent une protéolyse myofibrillaire excessive et une inhibition des voies de protéosynthèse (Perry et al, 2016). Ces mécanismes créent une fragilité musculaire, qui à terme engendre une altération de la masse musculaire appelée atrophie musculaire (DT1). Les risques de dommages musculaires sont alors augmentés chez les diabétiques (Schiaffino et al, 2008- Jerkovic et al, 2009).

De nombreuses recherches sont mobilisées pour lutter activement contre cette pathologie : des moyens médicamenteux et des thérapies non médicamenteuses (souvent complémentaires) comme l'activité physique et les compléments alimentaires ou des ingrédients biologiquement actifs ayant des vertus antioxydantes, anti-inflammatoires et insulino-sensibilisantes. En effet, l'entraînement a des effets positifs sur cette pathologie. Dans ce contexte pro-inflammatoire et oxydatif, un exercice inhabituel à composante excentrique accentue les dommages musculaires contrairement à un entraînement régulier chez les diabétiques (Teixeira de Lemos et al, 2012). C'est pourquoi, la combinaison de l'exercice avec un complément alimentaire ayant des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires pourrait contrebalancer les effets négatifs liés à ce type d'exercice.

Or la spiruline ou *Arthrospira* est composée de nombreux éléments essentiels intéressants pour notre organisme et ce contexte : des protéines, des oligosaccharides, des acides gras protecteurs, des vitamines, des minéraux... (Shabana et al, 2016-Jean Dupire, 2011). Différentes études ont mis en lumière les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires de la spiruline, qui pourrait limiter les facteurs stimulant la protéolyse et diminuant la synthèse protéique (Deng & Chow, 2010-Chen & Kotani, 2016). De plus cette micro-algue d'eau douce est riche en acides aminés lui conférant un rôle potentiellement intéressant dans la protéosynthèse (Stefanetti et al, 2014). L'ensemble de ces qualités font de la spiruline un potentiel acteur thérapeutique contre les dommages musculaires, utiles à la récupération musculaire post-exercice.

Afin d'étudier l'impact de la spiruline sur les dommages musculaires, nous avons utilisé un modèle de rat traité à la streptozotocine (STZ) s'apparentant à un modèle de rat



DT1. Certains de ces animaux ont également subi un exercice dommageable afin d'accentuer l'altération des fibres musculaires dans le but de percevoir les effets potentiellement bénéfiques de la spiruline sur l'atrophie musculaire via une modification de la balance protéique (protéolyse/protéosynthèse)

### Chapitre 1 : Diabète et dommages musculaires

---

#### 1- Diabète

##### 1.1) Types de diabète

La pathologie du diabète se décline sous deux formes : le DT1 et le DT2 (Kassab et al, 2003). Majoritairement, le DT1 apparaît avant 30 ans chez les sujets jeunes (Karen Geoffroy, 2005). Lors de cette pathologie auto-immune, l'infiltration de leucocytes (Macrophages et lymphocytes) détruit les cellules sécrétrices de l'insuline appelées cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans, provoquant des troubles de la sécrétion d'insuline. Cette absence d'insuline induit des troubles du métabolisme glucolipidique et des perturbations du métabolisme protéique (Widmaier et al, 2009-Jerkovic et al, 2009). Le DT2 survient majoritairement après 40-50 ans, notamment chez les sujets en surpoids ou obèses. Les diabétiques de type 2 présentent une déficience du système de reconnaissance du glucose et plusieurs anomalies interdépendantes : une insulino-résistance (IR), un déficit de l'insulino-sécrétion et une détérioration progressive des cellules  $\beta$  du pancréas et de leur fonction (insulinopénie, représentée au cours du temps, Cf. en Annexes Figure 1, Yang et al, 2014) (Bernard Catherine et al, 2013-Kassab et al, 2003).

##### 1.2) Modèles de rats diabétiques

Les modèles animaux permettant d'étudier les dysfonctionnements liés à cette pathologie et leurs mécanismes sont très variés. Le modèle murin est majoritairement utilisé car il possède une grande similitude génétique avec l'humain (99% de gènes exprimés dans les deux espèces, sur 30 000 gènes exprimés par les deux espèces, seulement 300 sont différents), se reproduit très facilement (nombre d'animaux) et il est facile à utiliser (contrairement à des primates par exemple). Le modèle rongeur semble le plus facile, bien qu'il soit moins propre que des modèles porcins, canins ou de primates.

Différents modèles de rongeurs diabétiques existent, des modèles génétiquement modifiés (Rat BBZDR/Worcester, Zucker diabetic fatty rat), ou des animaux nourris avec un régime enrichi en lipides et/ou en sucres pendant plusieurs semaines (modèles « High-fat diet-fed »). D'autres modèles utilisent des substances pharmacologiques comme l'alloxane ou la streptozotocine (STZ) (Wattiez et al, 2012). Selon la dose de substance chimique utilisée, le phénotype pathologique peut varier. En effet, sur des modèles murins, l'injection intrapéritonéale de STZ à forte dose (60-100 mg/kg) induit un phénotype de DT1, tandis qu'une faible dose (20-30 mg/kg) s'apparente plus au DT2 (Akbarzadeh et al, 2007). Une telle substance (DT1) provoque une hyperglycémie associée à une perte de masse corporelle (majoritairement en lien avec une atrophie musculaire et des pertes hydriques importantes), une hypo insulinémie, un stress oxydant (oxydation des protéines, des lipides et des acides nucléiques), un état pro-inflammatoire ainsi que de nombreux dommages en particulier des dommages musculaires (Cf. en Annexes Figure 2). Elle permet donc de développer un modèle d'étude dans un contexte pro-oxydant et pro-inflammatoire associé à des dysfonctionnements insuliniques à l'origine de perturbations du métabolisme musculaire (Diab et al, 2015-Rashid et al, 2015-Akbarzadeh et al, 2007). Cette perturbation des

métabolismes glucidiques et protéiques est à l'origine d'une atrophie musculaire caractéristique et d'une structure musculaire particulièrement fragile (Perry et al, 2016).

## 2- Masse musculaire, taille des fibres, balance protéique et diabète

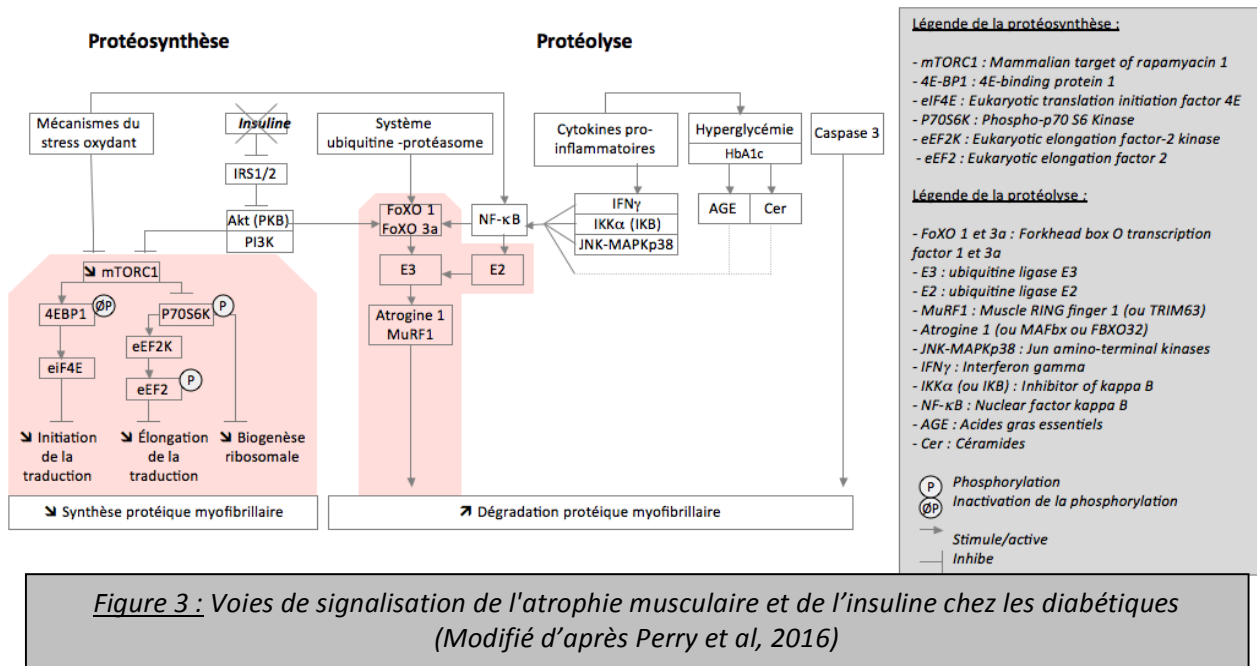
Les diabétiques (DT1 et DT2 dans les dernières phases) montrent une atrophie musculaire, représentée par une diminution de la masse des muscles ainsi que la surface de section des fibres musculaires (Perry et al, 2016- Acevedo et al, 2017). Ces phénomènes sont en lien avec une dérégulation de la balance protéique, résultant d'un déséquilibre entre la protéosynthèse et la protéolyse (Jerkovic et al, 2009).

Chez les sujets sains, les mécanismes de protéosynthèse sont sous la dépendance de la protéine IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) et de l'insuline. L'insuline et IGF-1 active les résidus sérines : IRS-1/2 (Insulin Receptor Substrate-1/2). Son activation engendre la phosphorylation et l'activation de Akt (Phosphokinase B), qui active à son tour mTORC1 (Mammalian Target Of Rapamycin 1) et déclenche la voie de synthèse protéique. De plus, un acide aminé appelé leucine stimule aussi mTORC1 via des voies de signalisation inconnues et diminue faiblement la dégradation protéique (Mosoni, 2014). Dans le modèle diabétique, en particulier STZ, la protéosynthèse est réduite *via* la surproduction de radicaux libres et les perturbations de la voie de l'insuline. En changeant l'activité de mTORC1, ces facteurs perturbent sa voie de signalisation, diminuant l'initiation et l'élongation de la traduction protéique et de la biogenèse ribosomale. En effet, le diabète altérerait la protéosynthèse en réduisant la phosphorylation de 4E-Binding Protein 1 (Perry et al, 2016). De plus, les dérivés sphingolipidiques comme les céramides (Cer) altèrent la protéosynthèse *via* la voie de l'insuline en réduisant la phosphorylation de Akt. Mais les données relatant le rôle des Cer dans le muscle restent encore à développer (Joffrey De Larichaudy, 2012).

Chez le sujet sain, la protéolyse est sous la dépendance de plusieurs mécanismes d'action en particulier le système ubiquitine-protéasome, les caspases, l'autophagie... Chez le sujet diabétique, la protéolyse est activée par plusieurs facteurs cataboliques comme la caspase 3, le système ubiquitine-protéasome, les voies de signalisation des cytokines pro-inflammatoires (IL1 $\beta$  (Interleukine 1 bêta), IL6 (Interleukine 6), TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha)), du stress oxydant *via* les glucocorticoïdes (cortisol), les perturbations de la voie de l'insuline et l'hyperglycémie (Perry et al, 2016-Mosoni, 2014). En l'absence de la phosphorylation de Akt, les FoXO migrent dans le noyau et activent la transcription FoXO 1 et 3a (Forkhead box O transcription factor 1 et 3a), qui provoquent l'activation de trois atrogènes responsables de la dégradation protéique myofibrillaire : l'ubiquitine ligase E3, MuRF1 (Muscle RING Finger 1) et l'atrogine 1 (Perry et al, 2016). Le contexte pro-oxydant et pro-inflammatoire active FoXO *via* la protéine NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B), TNF $\alpha$  comme le montre la figure ci-dessous (Cf. Figure 3). Parmi les facteurs pro-inflammatoires, nous pouvons noter la voie JNK (Jun amino-terminal kinases)-MAPKp38 (Mitogen-Activated Protein Kinases p38), la libération d'IFN $\gamma$  (InterFeroN gamma) et d'IKB (Inhibitor of kappa B (ou IKK  $\alpha/\beta$ )) (Nicolau et al, 2016). De plus, ces phénomènes sont amplifiés par la présence de protéines glyquées, des phénomènes de glycation eux-mêmes en lien avec l'hyperglycémie chronique (D. Bonnefont-Rousselot et al, 2004).

Ainsi le diabète joue un rôle délétère dans la balance protéique, à savoir dans l'altération des processus de protéosynthèse et l'activation majeure de la dégradation

protéique grâce à certains facteurs comme les cytokines pro-inflammatoires et le stress oxydant (Perry et al, 2016).



## 2.1) Inflammation, balance protéique et diabète

Les diabétiques présentent un état inflammatoire chronique de bas grade. Ces phénomènes favorisent l'insulino-résistance dans le muscle squelettique. En effet, les cytokines pro-inflammatoires comme  $TNF\alpha$ , IL6, CRP (C-Reactive Protein) ou  $IL1\beta$  bloquent la phosphorylation d'étapes clés de la voie insulinaire notamment au niveau IRS1/2 et Akt. CRP est stimulée *via* IL6 d'origine pro-inflammatoire et  $TNF\alpha$ . Au sein du tissu adipeux, elles sont surexprimées puis relarguées dans le sang et exercent enfin leurs effets sur les cellules cibles comme les tissus musculaires (Perry et al, 2016-Khalkhal et al, 2012). L'augmentation des cytokines résulte de l'infiltration des macrophages au sein des tissus cibles (Khalkhal et al, 2012). Plusieurs études menées chez des rats obèses et diabétiques montrent une élévation des niveaux des concentrations plasmatiques des cytokines d'origine musculaire ( $IL1\beta$  (De 120 à 400 pg/mL), IL6 (De 40 à 110 pg/mL), IL10 (De 55 à 90 pg/mL), IFN (De 25 à 50 pg/mL),  $TNF\alpha$  (De 14 à 70 pg/mL)) (Acevedo et al, 2017-Yang et al, 2014).

Les cytokines pro-inflammatoires activent la voie de signalisation JNK-MAPKp38 puis celle de NF-κB, qui inhibe IRS1/2. De plus, la formation de Cer intramusculaires stimule  $IKK\alpha/\beta$  provoquant l'activation de NF-κB, ce qui auto entretient ce phénomène. En outre,  $TNF\alpha$  stimule la voie de SOCS3 (Suppressor Of Cytokine Signaling 3) et baisse la voie de  $PPAR\gamma$  (Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma), qui perturbent aussi la voie de signalisation de l'insuline. La perturbation de la voie des PPARs engendre l'inactivation des gènes codant pour l'adiponectine. Cette inactivation de l'adiponectine diminue la sensibilité à l'insuline musculaire (Nicolau et al, 2016-Perry et al, 2016). Les taux diminuant d'adiponectine, l'utilisation du glucose n'est plus stimulée, ainsi que l'oxydation des acides gras (AG), ce qui limite le rôle anti-inflammatoire de l'adiponectine dans les muscles (Naomi Brooks et al, 2007). IL6 déclenche l'activation de SOCS3 via la voie JAK/STAT3 (Janus

kinase/Signal transducer and activator of transcription 3). En parallèle, la fixation de TNF $\alpha$  sur son récepteur TNF $\alpha$ RI (TNFR2) génère la formation de Cer. La surproduction de Cer intramusculaires entraîne un état inflammatoire, *via* la voie de signalisation ARA/COX2 (Acide ARachidonique/Cyclo-OXygénase 2), qui produit les composés néfastes comme les LeucoTriènes B4 (LTB4) ou les ProstaGlandines 2 (PGE2) (Perry et al, 2016). Or les LTB4 augmentent l'expression de gènes inflammatoire codant pour TNF $\alpha$ , IL6, MCP1 (Monocyte Chimoattractant Protein 1) (Cf. Figure 4 ci-dessous) (Li et al, 2015). Tous ces phénomènes concourent à un cercle vicieux inflammatoire.

Tous ces processus inflammatoires inhibent la phosphorylation des résidus sérines IRS et donc la réduction de la voie PI3K-Akt (Phosphatidylinositol 3 Kinase), qui limite le transport du glucose via les GLUTs (GLUT4 : Transporteur de Glucose 4) créant une surcharge glucidique et lipidique au sein des cellules musculaires et dans le plasma. L'hyperglycémie induit une intolérance au glucose (Glucotoxicité), au lipide (Lipotoxicité) et une IR. L'élévation des Acides Gras Non Estérifiés (AGNE), des AG acyl CoA issus de la dégradation des AG, des DiAcylglycérols (DAG) et des Cer jouent alors un rôle indirect dans la progression de la perte de sensibilité des tissus. Les Cer se révèlent le premier inducteur d'insulino-résistance (Nicolau et al, 2016-Perry et al, 2016).

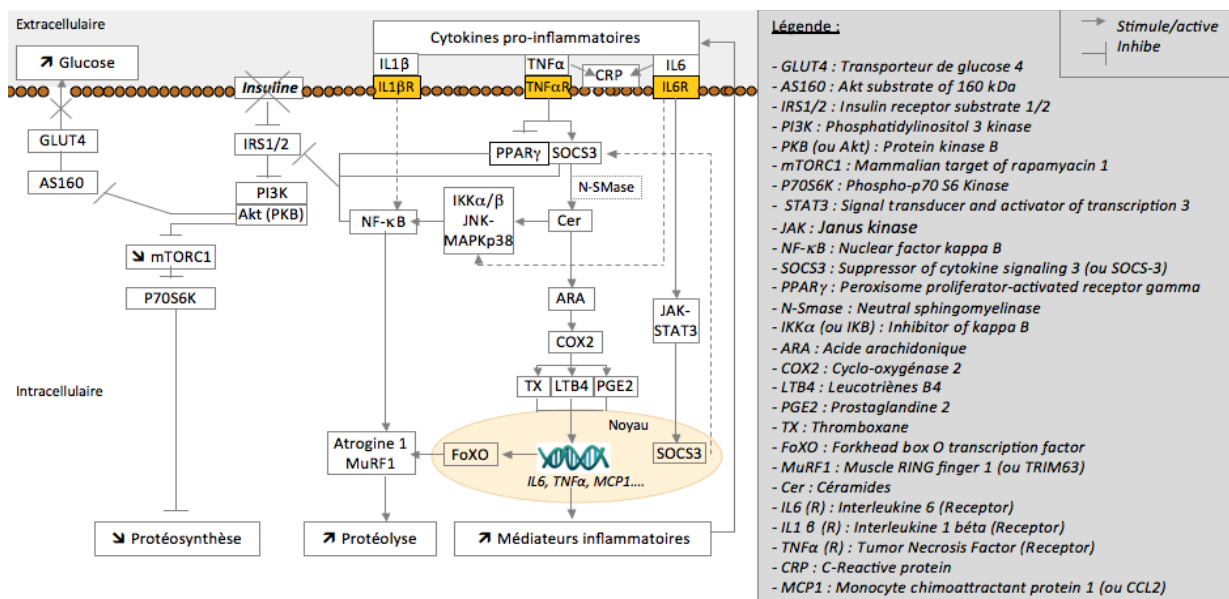


Figure 4 : Voies de signalisation de l'inflammation et de l'insuline dans les tissus musculaires chez les diabétiques (Modifié d'après Nicolau et al, 2016 - Perry et al, 2016)

## 2.2) Stress oxydant, balance protéique et diabète

Le stress oxydant (SO) est défini comme un déséquilibre entre les espèces pro-oxydantes et antioxydantes. Les espèces pro-oxydantes sont des molécules particulièrement réactives qui comprennent des radicaux libres (RL). Ils peuvent être dérivés de l'oxygène et de l'azote (ERON) : des ERO (Espèces Réactives dérivées de l'Oxygène) et des ERN (Espèces Réactives dérivées de l'Azote) (Cf. en Annexes Figure 5). Ces RL sont importants dans la signalisation cellulaire. En particulier pour la production de force, l'induction de biogenèse mitochondriale et l'initiation de la réponse inflammatoire ou des processus de régénération.

L'excès de radicaux perturbe le contrôle et la signalisation redox-sensible pouvant alors générer des dommages et des dysfonctionnements (Sies & Jones, 2007). Pour contrer les radicaux, l'organisme possède des systèmes de défenses appelés antioxydant (AO). Il se décline en un système enzymatique composé d'enzymes AO comme la catalase (CAT), la SuperOxyde Dismutase (SOD), la Glutathion Peroxydase (GPx) et d'un système non enzymatique composé essentiellement de vitamines (acide ascorbique ou C, alpha-tocophérol ou E, rétinol ou A et ses précurseurs : les caroténoïdes (dont  $\beta$  carotène) et de minéraux (cuivre  $\text{Cu}^{2+}$ , sélénium Se, zinc Zn), en plus de molécules ayant ce type de propriétés (le glutathion réduit GSH, l'acide urique..) (Cf. Figure 8). D'autres vitamines (B6, B9, B12) ont aussi des effets AO, mais moindre que celles citées précédemment. L'activation d'un contexte pro-oxydant mène alors à la diminution des systèmes antioxydants (Haleng et al, 2007). Les espèces pro-oxydantes produites en excès peuvent s'attaquer à des constituants cellulaires comme des acides nucléiques (ADN (Acide désoxyribonucléique) et ARN (Acide ribonucléique)), des lipoprotéines, des lipides (acide linoléique, acide arachidonique), des protéines (AA : cystéine, méthionine et tyrosine)). Ceci peut induire des dommages oxydatifs au niveau moléculaire, cellulaire et tissulaire. Selon la nature des constituants endommagés, des marqueurs peuvent témoigner des dommages occasionnés.

Des marqueurs de dommages au niveau des lipides membranaires sont le témoin de phénomène de peroxydation lipidique (4-hydroxy-2-nonène ou 4-HNE, MalonDiAldéhyde ou MDA, ThioBarbituric Acid Reactive Substances ou TBARS, MyeloPerOxidase ou MPO, CarboxyMéthylLysine, les isoprostanes, 12-hydroxy fatty acids, 15-hydroxy fatty acids. Les protéines carbonylés témoignent de l'altération des protéines (Inactivation ou oxydation) et la 8-oxo-2'-désoxyguanosine ou 8-OHdG celle de l'attaque des acides nucléiques (Mutations ou oxydation). Ces altérations structurales et fonctionnelles provoquent de nombreux dysfonctionnements cellulaires (Chen & Kotani, 2016-Deng & Chow, 2010-Haleng et al, 2007). Le déséquilibre de la balance pro et antioxydante peut aussi s'observer avec la baisse du rapport GSH/GSSG,  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}$  ou avec l'élévation du marqueur cystéine... Cependant, certains marqueurs comme la capacité antioxydante totale plasmatique restent difficiles à interpréter (Haleng et al, 2007). Il existe une seconde ligne de défense représentée par des systèmes de réparation cellulaire (protéasome, enzymes réductrices, systèmes de réparation de l'ADN).

L'interrelation diabète et stress oxydant reste un sujet controversé, le SO serait cause et/ou conséquence du diabète. Dans cette pathologie, aussi bien chez l'homme que chez l'animal, les ERON sont augmentés, les systèmes de réparation cellulaire sont moins efficaces et les systèmes de défenses (enzymatiques et non enzymatiques) sont diminués. Ainsi, la littérature montre des niveaux d'activité de la SOD (Cu/Zn/Mn), la CAT, le GPx inférieurs dans ces modèles diabétiques. Les concentrations en Zn, Se, les vitamines C, E sont aussi diminuées (Bonfont-Rousselot et al, 2004-Kassab et al, 2003).

Chez les diabétiques, plusieurs signalisations redox sont perturbées dans les cellules en particulier au niveau musculaire. Plusieurs facteurs (Bonfont-Rousselot et al, 2004-Joffrey De Larichaudy, 2012) sont à l'origine de ces perturbations : la perturbation du métabolisme de l'insuline (cause et conséquence), un statut martial anormalement élevé (réaction de Fenton :  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH} + \text{OH}^\bullet$ ), l'auto-oxydation du glucose, la glycation des protéines, la voie des polyols, de l'activation de l'angiotensine II, de la voie mitochondriale, de la NAD(P)H oxydase (Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Phosphate) Hydrogen oxydase) ou NOX (NOX2) musculaire, de l'Oxyde Nitrique Synthase (NOS, en

particulier iNOS) et de la Xanthine Oxydase (XO) (Cf. en Annexes Figure 6). En effet, la surcharge ferrique crée des dommages musculaires *via* la formation de RL au sein des cellules. La forme de stockage du fer appelée ferritine. Cette perturbation du métabolisme du fer est due au déclin de sécrétion d'insuline et à l'IR (Chen et al, 2015). Ces voies régulent et entraînent la transcription et l'expression de certains gènes (NF- $\kappa$ B, FoXO, Cer, MAPK...), qui activent des voies de signalisation délétères. L'activation de NF- $\kappa$ B engendre l'expression de iNOS, qui active à son tour la voie de NOX (Rigamonti et al, 2013) à l'origine de la surproduction de anion superoxyde comme celle liée à l'activation de XO.

Lors du diabète, une hyperglycémie associée à une hyperproduction radicalaire et à des défenses antioxydantes amoindries concourent à augmenter un déséquilibre de la balance pro-oxydants et antioxydants induisant des dommages oxydatifs (Kassab et al, 2003). Un mauvais contrôle glycémique engendre une altération des défenses antioxydantes et des dommages accrus (surtout au niveau protéique) au niveau musculaire (Bonfont-Rousselot et al, 2004). Ceci doit perturber la balance protéique et les voies de signalisation en lien avec la protéosynthèse et la protéolyse.

### **ROS et mécanismes d'action sur la protéosynthèse et la protéolyse :**

En effet, les espèces pro-oxydantes inhibent la protéine centrale dans l'initiation de la protéosynthèse mTOR, activent NF- $\kappa$ B, qui stoppe la voie insulinique au niveau de IRS1/2 (Cf. Figure 3). Alors les ERO concourent à diminuer la synthèse protéique (Perry et al, 2016). La production excessive d'ERO augmente la protéolyse dans les tissus musculaires, *via* la synthèse de Cer, l'activation de NF- $\kappa$ B et de la migration dans le noyau de FoXO (Cf. Figure 3) (Naomi Brooks et al, 2007-Bei Yao et al, 1995-Perry et al, 2016). Les produits issus des voies du SO et les phénomènes de glycation liés à l'hyperglycémie chronique comme l'Hémoglobine glyquée (HbA1c) et les AGE activent la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B (Kolesnick et al, 1994).

Toutes ces perturbations sont à l'origine du dérèglement de la balance protéique et donc de l'atrophie musculaire observée chez les diabétiques. Cependant le SO n'est pas le seul facteur à l'origine de ces dérèglements.

### **2.3) L'interrelation entre le stress oxydant et l'inflammation**

En effet, les RL régulent et génèrent la production de médiateurs immunitaires et inflammatoires comme TNF $\alpha$ , l'angiotensine II, iNOS et d'interleukines : IL1, IL2, IL3, IL6, IL8 (Reimund, 2002-Rigamonti et al, 2013). Ainsi le SO génère et/ou entretient l'état inflammatoire (et ses lésions) via les cytokines pro-inflammatoires et la chimiokine MCP1 qui favorise la migration des macrophages sur le lieu lésé (Teixeira de Lemos et al, 2012). D'un autre côté, lors de l'inflammation, la stimulation des neutrophiles et des macrophages cause la production de RL. Les cellules relarguent dans la circulation sanguine des médiateurs radicalaires (Cf. en Annexes Figure 5) (Reimund, 2002-Boumaza, 2009).

C'est donc la combinaison et l'auto-entretien SO/inflammation qui est à l'origine d'un cercle vicieux d'atrophie et de fragilité musculaire dans cette population. La baisse de la protéosynthèse, l'augmentation de la protéolyse, de l'inflammation, du SO, de l'IR et

d'autres facteurs à l'origine de l'atrophie et de la fragilité peuvent aussi accroître les dommages musculaires chez les diabétiques (Perry et al, 2016).

### 3- Dommages musculaires et diabète

#### 3.1) Dommages musculaires : contexte général et marqueurs

Un exercice inhabituel à composante excentrique cause des dommages musculaires, à savoir des dégâts intracellulaires comme la rupture des membranes cellulaires, déstructuration des stries z, du sarcomère, une baisse du taux d'alpha actine, des perturbations myofibrillaires et sanguines. Les dommages musculaires peuvent être détectés grâce à plusieurs indicateurs musculaires ou plasmatiques. Au niveau plasmatique, une augmentation de protéines initialement présentes au niveau musculaires (CK (Créatine Kinase ou CPK), LDH (Lactate DésHydrogénase)) est le témoin de ces dommages. Suite à des dommages tissulaires, les signaux liés à l'inflammation sont essentiels pour la mise en place de la réparation/régénération donc des médiateurs inflammatoires comme  $TNF\alpha$ , des interleukines (IL1 $\beta$ , IL6...) peuvent augmenter au niveau plasmatique et tissulaire. Ensuite, l'infiltration de macrophages au site de lésion est également un témoin de mise en place des étapes initiales liées à la régénération. Naturellement, des marqueurs de différenciation macrophagiques tels que CD68 (Cluster of Differentiation 68) et CD163 (Cluster of Differentiation 163) sont utilisés comme marquage de l'infiltration des macrophages de type 1 et 2. D'autres enzymes comme iNOS et COX-2 sont aussi considérés comme des marqueurs de dommages musculaires liés à l'inflammation (Schiaffino et al, 2008). L'expression de iNOS reflète l'infiltration des macrophages (neutrophiles) dans les fibres musculaires lésées. En particulier lors de la régénération musculaire, sa présence est indispensable pour résoudre la phase inflammatoire (Rigamonti et al, 2013).

#### 3.2) Dommages musculaires chez les diabétiques

Chez les diabétiques, ces phénomènes sont d'autant plus importants, à cause de la fragilité musculaire des sujets pathologiques et de leurs états pro-oxydants et pro-inflammatoires (Perry et al, 2016-Acevedo et al, 2017). L'hyperglycémie chronique mène à des troubles des voies protéiques impliquées dans la régulation de la masse musculaire et à des dommages musculaires via les voies du SO et l'activation des voies inflammatoires (Bonfont-Rousselot et al, 2004). Les muscles présentant une atrophie musculaire ont aussi une organisation anarchique avec beaucoup de fibres musculaires altérées (surtout dans les muscles EDL « Extensor digitorum longus ») (Le Moal, 2015). Cette atrophie est d'autant plus présente chez les DT1 (Jerkovic et al, 2009). Les diabétiques présentent des taux de l'enzyme iNOS, des cytokines pro-inflammatoires, des marqueurs de peroxydation lipidique (comme le MDA), des protéines musculaires (CK) plus importants que chez les rats sains (Perry et al, 2016-Yang et al, 2014-Chinedum et al, 2014).

#### 3.2) Dommages, régénération musculaire et diabète

**3.2.1) Régénération musculaire et phénotypes fonctionnels des macrophages :** Suite à des dommages musculaires, une réaction inflammatoire contrôlée facilite la récupération optimale et rapide des fibres musculaires endommagées. Lors du processus de régénération



musculaire, les macrophages pro-inflammatoires s'infiltrent dans les tissus quelques heures après les dommages et libèrent des médiateurs inflammatoires comme MCP1 et TNF $\alpha$ . Après un jour, lors du changement de phénotype appelé « skewing », les macrophages pro-inflammatoires (M1) deviennent anti-inflammatoires (M2), permettant la formation de nouveau tissu *via* la sécrétion de nouvelles cytokines comme TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor béta), IL10 et d'autres interleukines IL4, IL5, IL6, IL13. Alors, grâce à l'action de la protéine COX-2, les myoblastes prolifèrent, fusionnent pour se différencier en myotubes. COX-2 a donc un rôle à la fois myogénique et inflammatoire. Les macrophages M2 jouent un rôle myogénique, en diminuant la protéolyse *via* une diminution de l'activité du système ubiquitine-protéasome, en résolvant l'inflammation *via* l'augmentation de l'expression de la protéine CD163 dans les tissus inflammés et la diminution de la production d'ERDO. CD163 diminue l'induction des voies de signalisation inflammatoires, en régulant la sortie des cytokines pro-inflammatoires des tissus via les macrophages (Le Moal, 2015- Schiaffino et al, 2008).

Les marqueurs témoins de l'expression des macrophages M1 (iNOS et CD68) s'expriment fortement vers 2-3 jours après l'induction de lésions tissulaires en général (sujets sains), tandis que ceux des macrophages M2 (CD163) s'expriment plus tardivement, vers 3-4 jours (Bentzinger et al, 2013). Le changement de phénotype des macrophages est déterminé par la modification du ratio CD68/CD163.

**3.2.2) Régénération musculaire et diabète :** La régénération musculaire semble être perturbée chez les diabétiques. Les macrophages M1 sont davantage exprimés. Cette dysfonction des macrophages révèle une perturbation de la réaction inflammatoire (hausse de COX-2) lors de la régénération musculaire. La séquence pro-inflammatoire est amplifiée, ainsi que la production d'ERDO. La phase pro-inflammatoire plus longue pourrait révéler un décalage temporel de la réparation musculaire (Fabriek et al, 2005- Le Moal, 2015). Or si la réparation est retardée, la formation d'un tissu conjonctif excessif peut se former. Alors la qualité du tissu cicatriciel pourrait changer (Schiaffino et al, 2008). Mais les données à ce sujet sont extrêmement rares à notre connaissance et peu précises quant à la durée de chaque phase. Ces processus restent à explorer. Suite aux dommages musculaires chez les sujets diabétiques, les muscles sécrètent davantage de cytokines pro-inflammatoires : IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 ou d'autres interleukines IL2, IL12, IL18 et IL23. Or certains médiateurs pro-inflammatoires suppriment l'expression de l'ARNm codant et de la protéine CD163, qui est le témoin de la phase de formation de nouveaux tissus. La myogénèse et la formation de myotubes sont alors diminuées. L'absence de CD163 souligne la dysfonction des macrophages, qui est responsable de l'état inflammatoire chronique chez les sujets diabétiques (Fabriek et al, 2005- Le Moal, 2015). La modification du ratio CD68/CD163 pourrait contribuer à expliquer l'altération de la régénération musculaire chez les diabétiques.

Chez les diabétiques, surtout si les dommages musculaires sont déjà accentués en conditions basales, la réalisation d'un exercice physique inhabituel et/ou à dominante excentrique pourrait donc modifier les processus musculaires, accentuer les dommages et retarder la régénération musculaire.

#### 4- Diabète et exercice inhabituel ou aigu exhaustif à dominante excentrique

Contrairement à un entraînement régulier, un exercice aigu ne provoque pas d'adaptations (protéiques, enzymatiques...) bénéfiques et sur le long terme dans l'organisme. Les adaptations positives et durables nécessitent une répétition de l'exercice physique et des effets cumulatifs (Le Moal, 2015). Chez le sujet sain ou diabétique, en réponse à un exercice inhabituel ou à composante excentrique, nous pouvons observer des dommages musculaires, une augmentation des phénomènes de SO et inflammatoires, qui sont plus importants chez les diabétiques. Les taux supérieurs des médiateurs pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL6, MCP1) et oxydatifs (MPO, iNOS) en sont les témoins (Teixeira de Lemos et al, 2012).

Chez les sujets sains et diabétiques, immédiatement après un exercice dommageable, l'élévation de la sensibilité musculaire à l'insuline via IGF1 et l'élévation de la phosphorylation de mTOR et de p70S6K ne permettent pas de stimuler suffisamment la voie de la protéosynthèse face à l'activation massive de la dégradation protéique et à l'absence de phosphorylation de Akt (Perry et al, 2016-Stefanetti et al, 2014). Les taux des protéines MuRF1, Atrogine 1 et NF- $\kappa$ B restent élevés malgré la diminution du système ubiquitine-protéasome (Perry et al, 2016). L'évolution de FoXO après l'exercice aigu excentrique reste à être étudié chez les sujets diabétiques. Parallèlement les cytokines (IL6, IL8, IL15..) et les chimiokines (MCP1) augmentent fortement (Teixeira de Lemos et al, 2012).

Un jour après un exercice dommageable, les taux des marqueurs du SO (ARNm de iNOS) et de l'état inflammatoire (Expression de l'ARNm codant pour les protéines de TNF $\alpha$  et de MCP1) atteignent leur pic puis diminuent jusqu'à retrouver leur valeur basales les jours suivants. Tandis les marqueurs IL10 (ARNm) et CK ont leur pic vers 3 et 4 jours (Rigamonti et al, 2013). Chez les diabétiques, ces médiateurs cataboliques activent des éléments de la voie de protéolyse : le système ubiquitine-protéasome et l'atrogine 1 (ARNm). Les premiers jours, l'activité protéolytique reste donc dominante. Par la suite, ces signaux tendent à être réduits pour laisser place à la réparation musculaire via la stimulation d'IL10 (Perry et al, 2016).

Or l'exercice est largement recommandé pour la population diabétique. Il est donc inévitable d'exposer les sujets à des phases excentriques (au moins pour certains groupes musculaires). Le fait d'envisager des stratégies nutritionnelles ou des compléments alimentaires semble judicieux pour limiter l'atrophie musculaire, les phénomènes dommageables, pour lutter contre l'inflammation et le stress oxydant afin de mettre en place une activité physique dans un contexte favorable. Parmi les compléments alimentaires disponibles sur le marché, une micro-algue ayant des vertus antioxydantes, anti-inflammatoires, insulino-sensibilisantes et naturellement très riche en acides aminés peut être donc être une stratégie nutritionnelle intéressante.

## Chapitre 2 : Spiruline et ses effets sur les dommages musculaires

---

### 1- Composition et propriétés de la spiruline

La spiruline (*Arthrospira* ou *Spirulina*) est une micro-algue bleue verte, composée de nombreux éléments essentiels pour notre organisme (Shabana et al, 2016-Jean Dupire, 2011-Braakhuis et al, 2015). Il en existe plusieurs espèces, la plus commune est *Arthrospira*

*platensis*. Cette micro-algue d'eau douce est considéré comme un super-aliment et une source thérapeutique possédant de nombreuses propriétés : antioxydantes (AO), anti-inflammatoires (AI), anti-anémiques (AA), anti-diabétiques (AD), anti-athérogène parmi d'autres (anti-cancer, anti-infectieux, anti-viral...) (Thang et al, 2015-Wang et al, 2007). Ces effets bénéfiques résultent de ses activités hypoglycémiques, hypolipidémiques et insulinosensibilisantes (Deng & Chow, 2010). Les composés à l'origine de ces propriétés sont soulignés dans la figure ci-dessous et permettent de faire ressortir leur rôle important dans la modulation de la masse musculaire :

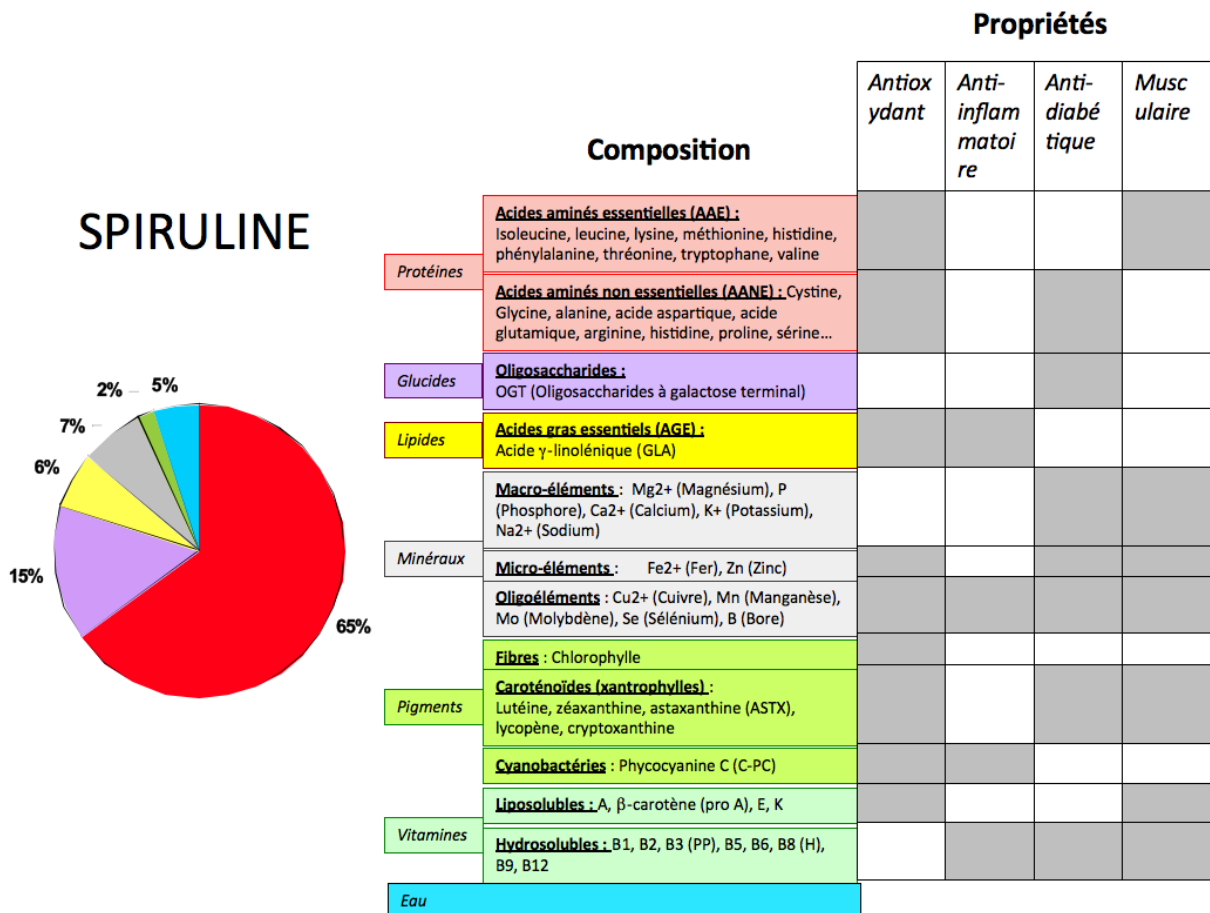


Figure 7 : Composition et propriétés actives de la spiruline (Modifié d'après Thang et al, 2015 - Wang et al, 2007)

## 2- Spiruline, diabète, balance protéique et dommages musculaires

### 2.1) Propriétés anti-inflammatoires de la spiruline

Lors d'un état inflammatoire chronique, cette micro-algue diminue les éléments clés des voies de signalisation inflammatoires : COX2-LTB4/PGE2, NF- $\kappa$ B-IKK $\alpha$  et JNK-MAPKp38. Elle diminue l'expression des gènes suivants : TNF $\alpha$  (Lee et al, 2008), TNF $\beta$  (Tumor Necrosis Factor-Beta ou LT $\alpha$  (LymphoToxin-alpha)), IL1 $\beta$ , IL4, IL6 (Lee et al, 2008), connus pour amplifier la boucle inflammatoire, mais pas les protéines IL2 et IFN $\gamma$  (Interferon gamma). Particulièrement, suite à la stimulation de IFN $\gamma$  ou de la LipoPolySaccharide (LPS) par les macrophages, le  $\beta$ -carotène inhibe la transcription d'IL1 $\beta$ , d'IL6, d'IL12.

De plus, la richesse en acide  $\gamma$ -linoléique (GLA) de la spiruline favorise la synthèse de métabolites anti-inflammatoires comme les ProstaGlandines 1 (PGE1) via sa conversion en Acide dihomogamma-linoléique (DHLA) (Ide et al, 2017).

Grâce à ses composés (C-PC, ASTX,  $\beta$ -carotène et GLA), elle pourrait enrailler le cercle vicieux inflammatoire (Cf. Figure 8 ci-dessous).

## 2.2) Propriétés antioxydantes de la spiruline

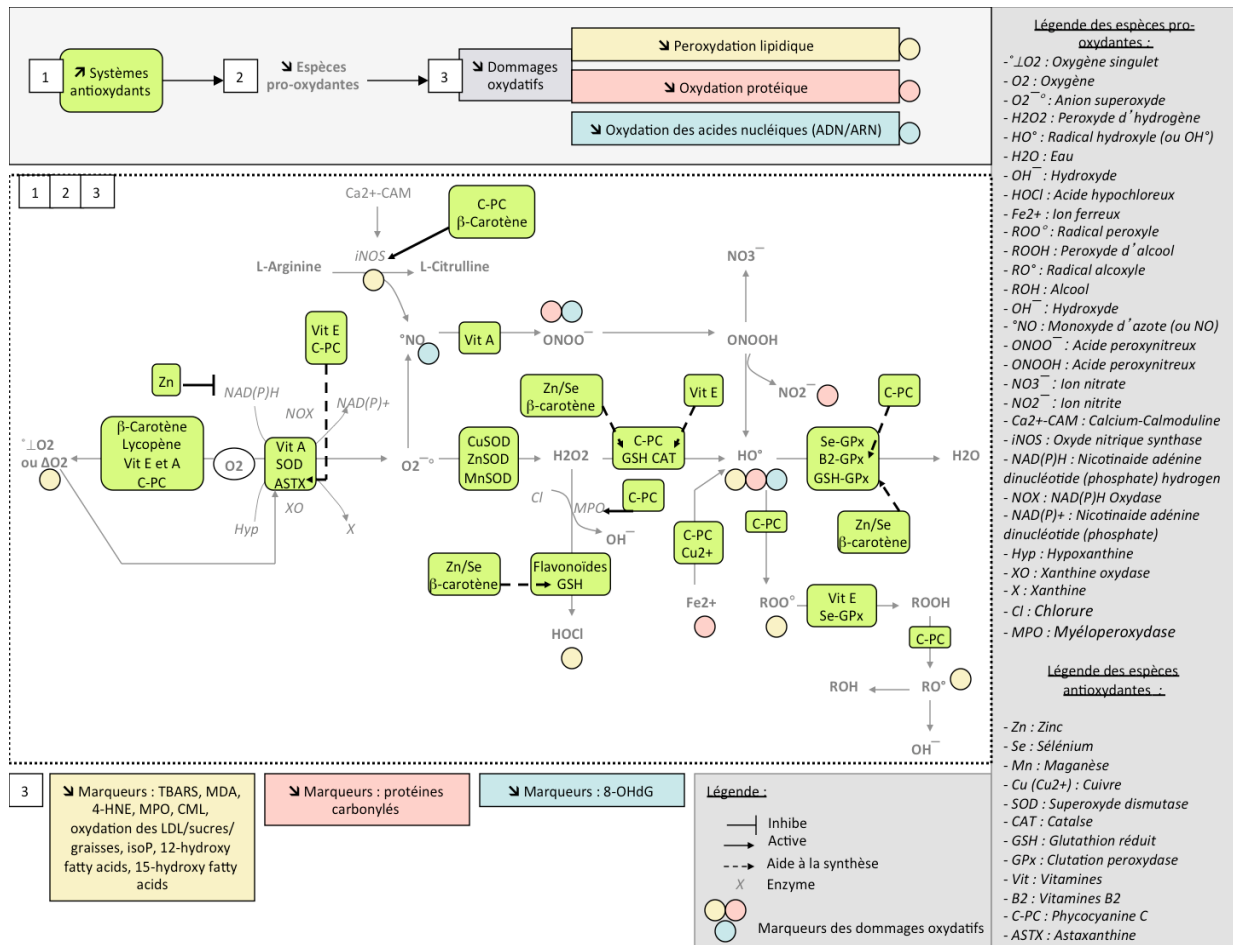
La spiruline pourrait diminuer les effets délétères des espèces pro-oxydantes *via* les antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques, en maintenant la signalisation redox des cellules. La spiruline exerce ses propriétés antioxydantes grâce à ses composés actifs : les vitamines antioxydantes (A,  $\beta$ -carotène, B2, E), les minéraux antioxydants (Zn,  $\text{Cu}^{2+}$ , Mn, Se), la C-PC et les caroténoïdes (ASTX, lycopène). Il faut noter qu'elle ne possède pas de quantité intéressante en vitamine C. En outre, elle augmente aussi les systèmes enzymatiques (SOD, CAT, GPx, GR, HO-1, Trx, PON1) et leurs minéraux ( $\text{Cu}^{2+}$ , Zn, Mn, Se) servant de coenzymes associés, les systèmes non enzymatiques GSH, Mo, Mn, les acides aminés (méthionine et cystéine), les vitamines antioxydantes (B5, B9) et GLA (Pincemail et al, 2002- Reimund, 2002- Wided, 2014- Deng & Chow, 2010- Manet, 2016).

Chaque composé de la spiruline neutralise la formation et la production d'une ou plusieurs espèces pro-oxydantes spécifiques (Cf. Figure 9 ci-dessous) (Bermejo et al, 2008- Reimund, 2002- Boumaza, 2009). Pour contrer les RL et protéger davantage les constituants des cellules de l'agression des radicaux libres, certains éléments agissent en synergie entre eux :  $\text{Cu}^{2+}$ /Vitamine E, Se/Vitamine E, vitamine E-C/glutathion (Pincemail et al, 2002- Reimund, 2002). Tandis que d'autres composés AO ont un effet "scavenger" pour éliminer les déchets (Deng & Chow, 2010). De plus, GLA joue un rôle de protection contre le SO, en modulant la production et l'accumulation d'acide gras (Ide et al, 2017) cible potentielle de peroxydation. La vitamine B9 diminue le stress SO en limitant la concentration plasmatique d'homocystéine, qui est un facteur de risque endothélial. En apportant des AA, les protéines aident à la formation et à la production du glutathion et de l'albumine (Reimund, 2002).

À partir de trois semaines de complémentation, les propriétés AO et anti-inflammatoires de la spiruline agissent sur la pathologie du diabète, au niveau des marqueurs de peroxydation lipidique et du statut total AO. Cependant, une complémentation de huit semaines semble plus efficace (Deng et Chow, 2010).

Les constituants et propriétés AO de la spiruline limite les phénomènes de peroxydation lipidique. Cet effet est attesté par la diminution des marqueurs comme TBARS, MDA, 4-HNE, MDA, MPO, isoP, 12-hydroxy fatty acids, 15-hydroxy fatty acids, l'oxydation des LDL *via* la  $\beta$ -carotène et l'ASTX, des graisses et des sucres (Carbohydrates) (Chen & Kotani, 2016- Deng & Chow, 2010- Boumaza, 2009- Lu et al, 2006- Lee et al, 2008). De même, la spiruline diminue l'oxydation des protéines *via* l'ASTX, la C-PC et l'action du fer et du zinc. Les protéines carbonylées diminuent en conséquence (Chen & Kotani, 2016- Wided, 2014). La C-PC diminue le SO engendré par le fer en diminuant sa forme libre dans le sang (Via les transporteurs appelés céruplasmine et héphaestine) et sa forme de stockage (Ferritine). La C-PC et l'ASTX diminuent l'oxydation des acides nucléiques comme l'ADN. Ces effets bénéfiques sont montrés *via* la diminution du marqueur : 8-OHdG (dans les tissus

plasmatiques et hépatiques) (Chen & Kotani, 2016- Estrada et al, 2001- Janina et al, 2016). La *Figure 8 ci-dessous* illustre ces propos.



*Figure 8 : Implications des propriétés antioxydantes de la spiruline dans le stress oxydant chez les diabétiques (Modifiés d'après Haleng et al, 2007 - Reimund, 2002 - Chen & Kotani, 2016 - Deng & Chow, 2010 - Boumaza, 2009)*

Donc, grâce à sa richesse de ses composés AO, la spiruline permet de limiter la production de RL et donc de limiter les potentiels dommages au niveau des lipides, des protéines et des acides nucléiques (Braakhuis et al, 2015).

### 2.3) Propriétés insulino-sensibilisantes et hypolipidémiantes de la spiruline

Les activités hypoglycémiques et hypolipidémiques de la spiruline affectent l'hyperglycémie, en baissant les taux plasmatiques de glucose, de triglycérides, de Lipoprotéine de basse densité (LDL) et Lipoprotéine de très basse densité (VLDL). Mais, les effets de la spiruline sur l'augmentation ou non des taux de Lipoprotéine de haut densité (HDL) restent contradictoires. Grâce au composé actif appelé C-PC, la propriété insulino-sensibilisante de la spiruline permet de diminuer l'hyperglycémie, d'augmenter la sensibilité à l'insuline et donc de diminuer l'IR (Deng & Chow, 2010). Mais une partie des effets insulino-sensibilisants s'exercent via les effets AO et anti-inflammatoires.

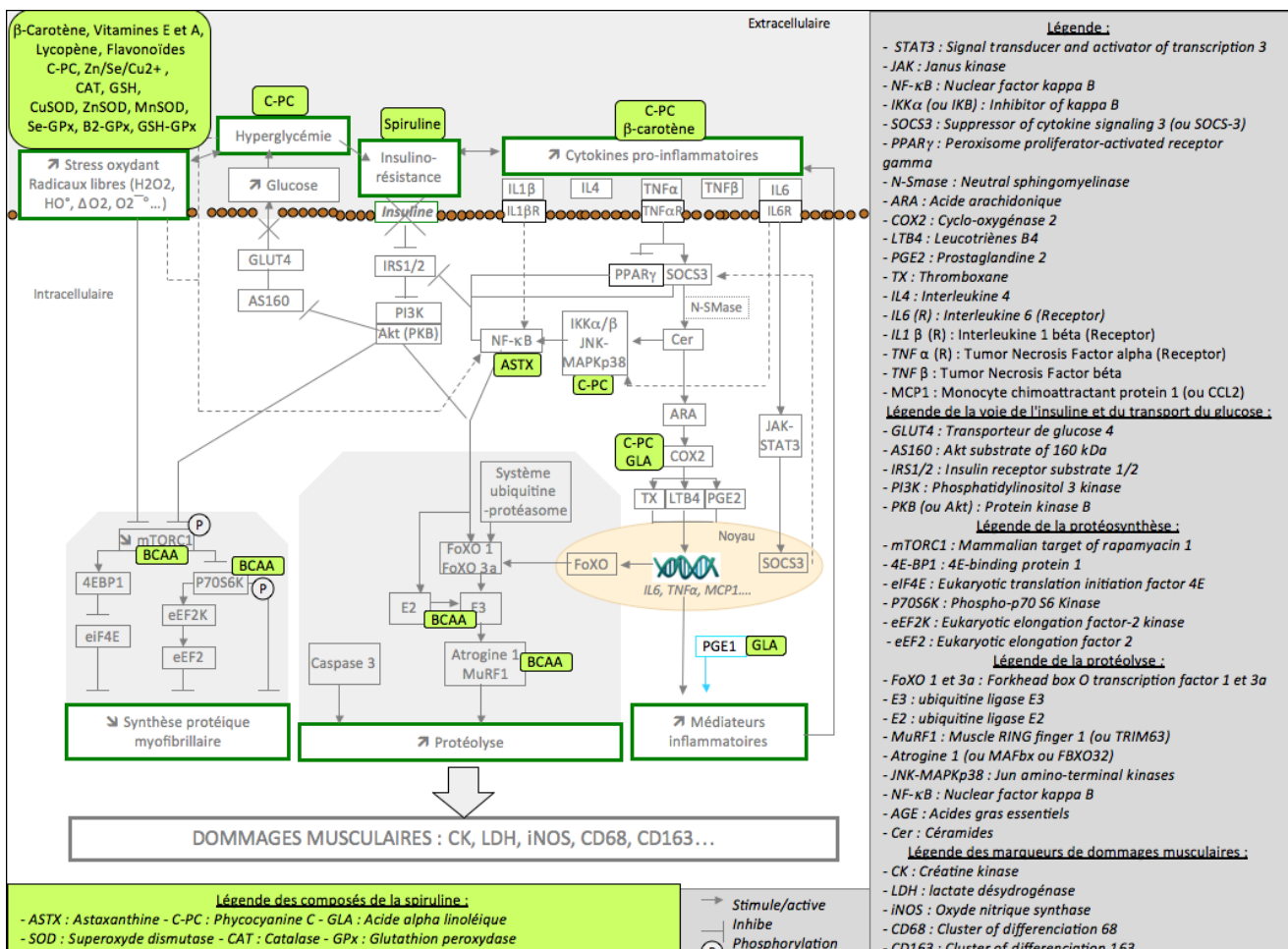
Quatre semaines de complémentation commencent à révéler les activités hypoglycémiques et hypolipidémiques de la spiruline, mais huit semaines à trois mois de complémentation sont plus bénéfiques (Deng & Chow, 2010).

## 2.4) Spiruline et balance protéique : protéosynthèse et protéolyse

En limitant les effets néfastes des espèces pro-oxydantes et pro-inflammatoires à travers leurs voies de signalisation, la spiruline pourrait diminuer les facteurs de la protéolyse et activer la protéosynthèse (Deng & Chow, 2010). Cependant, pour certains elle ne semble pas affecter la voie de signalisation centrale de la protéolyse (Fabricio & Maria, 2008). Néanmoins, dans une étude chez le rat, une supplémentation en Acides Aminés à Chaîne ramifiée (BCAA) diminue l'expression de l'ARNm codant pour les protéines atrogène 1, MuRF-1 et peut être les ubiquitines ligases, et augmentent les contenus en protéines totales après un exercice excentrique. Or la spiruline est riche en BCAA comme la leucine, valine et isoleucine. Elle pourrait alors augmenter l'activité de mTOR en changeant l'expression de son ARNm et donc stimuler la protéosynthèse tout en limitant la protéolyse et ainsi atténuer l'atrophie musculaire (Stefanetti et al, 2014). Cela reste encore à vérifier. Ainsi cette micro-algue pourrait limiter plusieurs processus responsables de l'atrophie musculaire dans le cadre du diabète et de ce fait limiter les dommages musculaires (Cf. Figure 9 ci-dessous).

## 2.5) Spiruline et dommages musculaires

En intervenant sur les processus qui modulent la masse musculaire, comme la protéolyse et la protéosynthèse, la spiruline limiterait ces dommages *via* les voies de signalisation suivantes (Braakhuis et al, 2015) (Cf. Figure 9 ci-dessous) :



*Figure 9 : Rôle de la spiruline dans la limitation des dommages musculaires chez les diabétiques - Voies de signalisation*

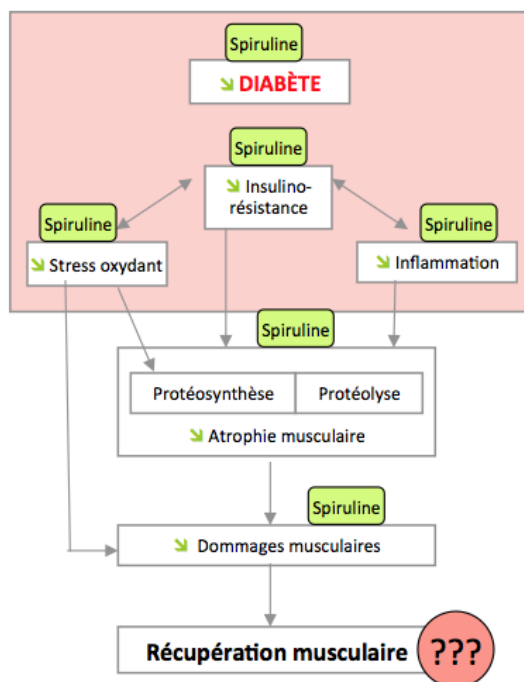
Cela reste théorique, car très peu de données sont présentes à ce sujet. En effet, la spiruline réduit les dommages musculaires induits par un exercice en baissant les indicateurs comme CK et LDH au niveau plasmatique (Lu et al, 2006).

### SYNTHÈSE : Spiruline, le muscle (masse et dommage) et la récupération musculaire

Lors du diabète, l'association de facteurs (État inflammatoire de bas grade, stress oxydant, hyperglycémie chronique, altération de la voie insulinique..) inhibe la voie de signalisation de la protéosynthèse et active le catabolisme des protéines, à l'origine de l'atrophie et pouvant contribuer à accentuer des dommages et ainsi perturber la régénération musculaire. Les diabétiques doivent donc porter une attention particulière aux temps de repos, de récupération, à contrôler davantage leur alimentation dans le cadre général et encore plus s'ils réalisent un exercice inhabituel ou potentiellement dommageable afin d'en limiter les conséquences délétères.

Des compléments alimentaires ou ingrédients biologiquement actifs aux propriétés AO, anti-inflammatoires et insulino-sensibilisantes pourraient influencer positivement la récupération musculaire, en limitant les dommages musculaires dus à un exercice inhabituel ou à composante excentrique. De même, des composés à forte teneur en AA et aux propriétés précitées pour limiter l'atrophie musculaire donc sa fragilité et de surcroît d'éventuels dommages.

La spiruline possédant à la fois ses propriétés et une richesse naturelle en AA (dont des BCAA) apparaît comme une stratégie nutritionnelle intéressante dans ce cadre (Cf. Figure 10). D'autant plus que les études de complémentation en spiruline combiné à l'exercice sont très limitées et explorent peu les mécanismes au niveau musculaire.



*Figure 10 : Relation entre spiruline, atrophie, dommages musculaires et diabète*

## OBJECTIFS

---

Ainsi, la spiruline pourrait constituer un moyen thérapeutique non-médicamenteux, intéressant pour limiter l'atrophie, les dommages et ainsi favoriser la récupération musculaire, chez les patients atteints de diabète.

L'objectif de ce mémoire est donc d'étudier dans un modèle animal diabétique caractérisé par un contexte pro-oxydant, pro-inflammatoire associé à des dysfonctionnements insuliniques, l'impact d'une complémentation de quatre semaines en spiruline sur :

- La masse musculaire, la taille des fibres (surface de section des fibres musculaires), la balance protéique avec des marqueurs sériques de protéines totales et albumine, des acteurs clés des voies de signalisation liés à la protéosynthèse et la voie insulino-dépendante (Akt et p-Akt), de protéolyse et son activation *via* la voie inflammatoire (FoXO 3a et NF-κB).
- Les dommages musculaires et l'inflammation tissulaire à travers les marqueurs plasmatiques (CK, LDH) et musculaires (iNOS, CD68 et CD163).
- Les marqueurs du statut pro-oxydant/antioxydant et marqueurs de dommages oxydatifs (4-HNE, MPO)

Nous posons l'hypothèse, dans ce modèle diabétique, qu'une telle complémentation pourrait :

- Limiter l'atrophie musculaire en diminuant la protéolyse et/ou en augmentant la protéosynthèse
- Limiter les dommages musculaires induits par le diabète et par un exercice à fortes composantes excentriques

Nous vérifierons qu'une partie des mécanismes s'exercent grâce aux propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et insulino-sensibilisantes de la spiruline.



## MATÉRIEL ET MÉTHODE

### Chapitre 1 : Design expérimental

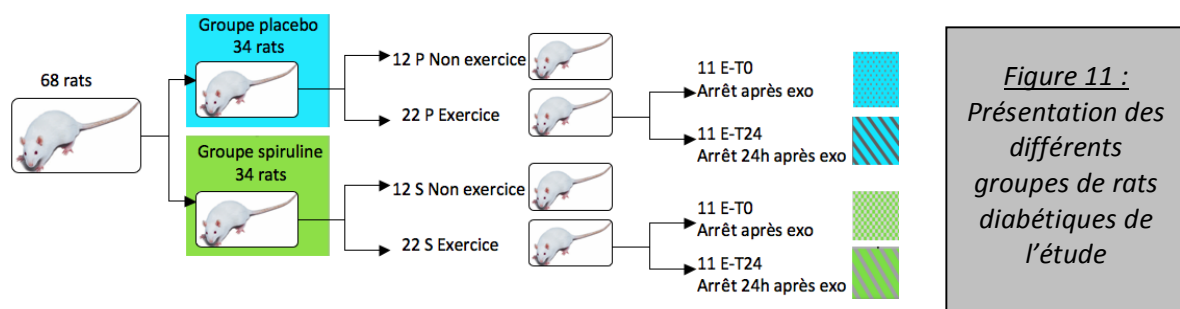
Ce protocole a reçu un avis favorable du comité d'éthique rennais et une autorisation de projet du ministère. Les locaux d'hébergement et d'expérimentation animale sont agréés par la DDPP. Cette étude est réalisée sur des rats mâles, qui ont un poids corporel et un volume musculaire plus important que les rats femelles, afin de mettre en valeur les dommages musculaires. De plus, les souches Wistar sont des meilleurs modèles au niveau de l'étude du diabète (Rashid et al, 2015-Akbarzadeh et al, 2007-Jerković et al, 2009).

#### **Caractéristiques des rats mâles (N = 68) :**

68 rats mâles de souche Wistar âgés de 9 semaines sont hébergés individuellement dans des cages standard de laboratoire (355\*235\*190 mm) de manière à contrôler l'alimentation, l'hydratation, la température (20 à 24°C) et l'hygrométrie (50%) avec un dispositif de cycle lumière-obscurité 12/12 heures. En fonction des groupes attribués placebo (P) ou spiruline (S), ils se sont nourris avec des granulés ou avec des granulés comportant de la spiruline (*Arthrospira Platensis*) à raison de 300 mL/kg/jour. La quantité de spiruline est réajustée chaque semaine en fonction du poids des rats durant quatre semaines. Cette spiruline sanitaires sûre, fournie par AGV. Les caractéristiques produites sont déterminées par Labexia (Cf. Annexes Tableau 1). Une analyse du taux de phycocyanine a été effectuée par la SGS (Société Générale de Surveillance). Les animaux ont accès à l'eau *ad libitum*. Chaque jour, l'alimentation, l'hydratation, les apports alimentaires et l'état de santé des rats ont été vérifiés, tandis que le poids et la glycémie sont mesurés tous les 4 jours.

#### **Modèle de rats STZ :**

Après une semaine en quarantaine, nous avons rendu les rats diabétiques par une injection intrapéritonéale de 45 mg/kg de streptozotocine (STZ) dans du tampon citrate (pH = 4,5). 48 heures après l'injection de STZ, le contrôle de la glycémie permettait de confirmer le diabète (Valeur glycémie > 250 mg/dL). De manière aléatoire, les rats sont répartis en deux groupes complémentés en spiruline (N=34) ou non (placebo, N=34) pendant quatre semaines. À l'issue, certains réaliseront un exercice dommageable. Enfin, une partie des rats est sacrifiée immédiatement à l'arrêt de l'exercice (E-T0, N=11+11) et une autre 24h après (E-T24, N=11+11). Le design expérimental est représenté en Figure 11 avec son code couleur :



**Figure 11 :**  
Présentation des différents groupes de rats diabétiques de l'étude

#### **Protocole d'exercice :**

Après les quatre semaines de complémentation ou non, les rats ont été soumis à un exercice exhaustif en descente décrit dans la littérature comme provoquant des dommages musculaires (Armstrong et coll. Peter, 2008). Il comprend deux parties. Une familiarisation de course sur tapis roulant où les rats effectuent une course sur un tapis roulant, à une vitesse de 6 m/min, sur une pente nulle pendant 5 minutes pendant 4 jours consécutifs. Lors du protocole, le jour de l'exercice dommageable, ils courent avec une pente descente de 16%, à une vitesse de 16 m/min, jusqu'à l'épuisement.

## Chapitre 2 : Sacrifices et prélèvements de tissus

---

Les rats sont ensuite euthanasiés par un sur-dosage de xylazine (4 mg/kg) et de kétamine (50 mg/kg). Puis le sang est récolté par prélèvement rétro-orbital. Afin de récolter le plasma, les échantillons sont centrifugés 10 minutes à 1500g. Les tissus musculaires sont prélevés, pesés et congelés immédiatement dans de l'azote liquide et stockés à -80°C pour des analyses ultérieures. Les muscles soléaires (SOL), gastéronémiens, EDL et tibialis (TIB) sont sélectionnés pour l'étude. Selon leur dominance, ils ont une composition variable en fibres de type 1 (Soléaire à 87-95%) et 2 (Gastéronémiens, EDL à 28-41% IIa et 21-58% IIb, tibialis) (Jerković et al, 2009). Cette large composition de type de fibre permet de spécifier les résultats au niveau musculaire en fonction de la typologie. Après un exercice dommageable en descente, les muscles soléaires révèlent un nombre de dommages musculaires plus importants que les autres types de muscles (Augusto et al, 2004). Ils feront donc l'objet de la présente étude.

## Chapitre 3 : Analyses biochimiques et biologie moléculaire

---

### 1- Analyse de l'expression des protéines par Western Blot

Pour les voies de signalisation impliquée dans la protéolyse, la protéosynthèse, de l'inflammation, le signal insulinaire, les protéines musculaires et un marqueur de stress oxydant, les marqueurs suivants sont étudiés : FoXO 3a, Akt (p-Akt), NF-κB p65 et 4-HNE par la technique de Western Blot. Au préalable, les échantillons musculaires ont été cryobroyés à l'aide d'azote liquide afin de garder les protéines intactes. Puis chacune des protéines a été soumise aux différentes étapes du Western (séparation sur gel acrylamide en fonction de la taille des protéines, transfert des protéines d'intérêt sur membrane de nitrocellulose et détection par anticorps primaires spécifiques et immunofluorescence grâce à l'anticorps secondaire. Le détail de ces étapes et des anticorps utilisés est décrit en *Annexes Figure 12 et Tableau 2*). Le contenu de nos protéines d'intérêt est calculé à partir d'une protéine de référence invariante HSC70 (Intensité de fluorescence de la protéine/Intensité de fluorescence HSC70) et l'activation d'une protéine d'intérêt à partir de sa forme totale et phosphorylée (Intensité de fluorescence de la protéine (phosphorylée)/ Intensité de fluorescence de la protéine (totale)).

### 2- Analyse biochimique par spectrophotométrie

Les concentrations plasmatiques de glucose (Méthode GOD-PAP), la fructosamine, les contenus protéines totales, l'albumine, CK, LDH, l'acide urique, fer et de ferritine

plasmatiques sont déterminées par méthodes enzymatiques et colorimétriques à l'aide d'un automate de lecture appelé Pentra 400. Les densités optiques utilisées sont 500 nm pour la détection du glucose et d'acide urique, 450 nm pour CK et LDH et 560nm pour le fer et la ferritine.

### 3- Analyse musculaire : surface de section et marqueurs par technique d'immunohistochimie

La masse musculaire sera présentée sous forme de moyenne des muscles droit et gauche par chaque muscle (EDL, SOL, TIB). La surface de section des fibres musculaires est déterminée à partir de coupes transversales des soléaires, suite à une coloration Hématoxyline-Eosine. La technique d'immunohistochimie a permis de détecter les substances chimiques témoin des marqueurs de dommages et inflammation musculaires par un anticorps dirigé contre les protéines d'intérêts suivantes : CD68, CD163, iNOS et MPO, grâce à l'automate DISCOVERY XT (Roche<sup>°c</sup>, Illkirch, France). Les tissus inclus en paraffine sont coupés au microtome pour réaliser des coupes de 4µm. Après la préparation des tissus, les anticorps primaires sont déposés pour reconnaître les antigènes (Protéines). L'immunoréaction est visualisée avec un traceur enzymatique HRP couplé avec l'anticorps secondaire révélant le système anticorps-antigène. Les coupes subissent une coloration nucléaire avec de l'hématoxyline de Mayer, pour être déshydraté et monté entre une lame et une lamelle. Les étapes sont détaillées en annexes (*Cf. Tableau 3*). Nous avons choisi iNOS, CD68, CD163 comme marqueurs de l'inflammation et MPO comme marqueurs de dommages musculaires.

## Chapitre 4 : Étude statistique des résultats

---

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne et d'écart type. Si les tests de normalité, d'échelle d'intervalle et d'homogénéité des variances sont positifs, les différents groupes sont comparés par une ANOVA à deux facteurs suivants : complémentation en spiruline (Traitement) et exercice aigu. Dans le cas contraire, les échantillons sont soumis à un test de Krustal-Wallis. Si l'ANOVA à deux voies dévoile une différence significative ( $p < 0,05$ ), alors un test post-hoc HSD de Tukey est réalisé pour révéler des potentiels de différences entre les groupes. Ces analyses statistiques sont effectuées grâce au logiciel « GraphPad Prism 6 Trial ».

## RÉSULTATS

---

### Chapitre 1 : Induction du diabète et validation du modèle diabétique

---

Nos résultats montrent clairement que l'injection de STZ utilisée (45 mg/kg) induit une hyperglycémie chronique. Les valeurs de glycémie, de glucose et de fructosamine sont supérieures aux valeurs basales (Glycémie > 250 mg/dL, Glucose > 7,1 mmol/L et fructosamine > 126 umol/L, trait rouge) (Akbarzadeh et al, 2007-Acevedo et al, 2017). Les valeurs plasmatiques supérieures de glycémie attestent de l'induction du diabète (*Cf. Annexes Figure 13*) et celles de glucose et de fructosamine très élevées attestent de l'hyperglycémie chronique et d'un mauvais contrôle glycémique (*Cf. en Annexes Figures 18*

et 19). Quatre rats sont sortis du protocole à ce stade, l'induction du diabète n'ayant pas fonctionné. Quatre semaines de complémentation ne semblent pas suffisantes pour induire une diminution de la glycémie et améliorer le contrôle glycémique des rats diabétiques. La combinaison de la complémentation et de l'exercice ne semblent pas induire de modification du contrôle glycémique.

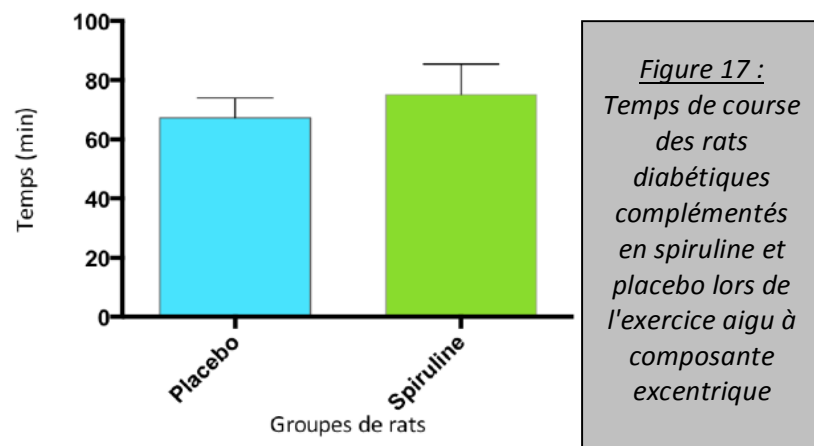
## Chapitre 2 : Effets de la complémentation en spiruline et/ou de l'exercice aigu sur les dommages musculaires

### 1- Effets de la spiruline et/ou de l'exercice sur la masse corporelle

Dès l'induction du diabète, dans les deux groupes, nous pouvons remarquer une petite perte de masse corporelle dans la première semaine, puis dans la deuxième semaine une légère prise de masse apparaît et une stabilisation de la masse corporelle apparaît entre la 3<sup>ème</sup> et la 5<sup>ème</sup> semaine. Ces phénomènes sont classiquement décrits dans la littérature (Akbarzadeh et al, 2007). Après 4 semaines de complémentation en spiruline, la masse corporelle des animaux complémentés est relativement similaire aux rats non complémentés (Cf. en Annexes Figure 14). Ces résultats sont en adéquation avec une prise alimentaire totale ou rapportée en gramme/jour non différente entre les deux groupes (Cf. en Annexes Figures 15 et 16).

### 2- Effets de la spiruline sur le temps de course

Nous pouvons observer un temps de course légèrement supérieur chez les rats complémentés en spiruline (75,1±48,4 vs 67,0 ±31,4 minutes,  $p=0,52$ ) comparés au groupe placebo bien que les résultats ne sont pas significatifs (Cf. Figure 17).

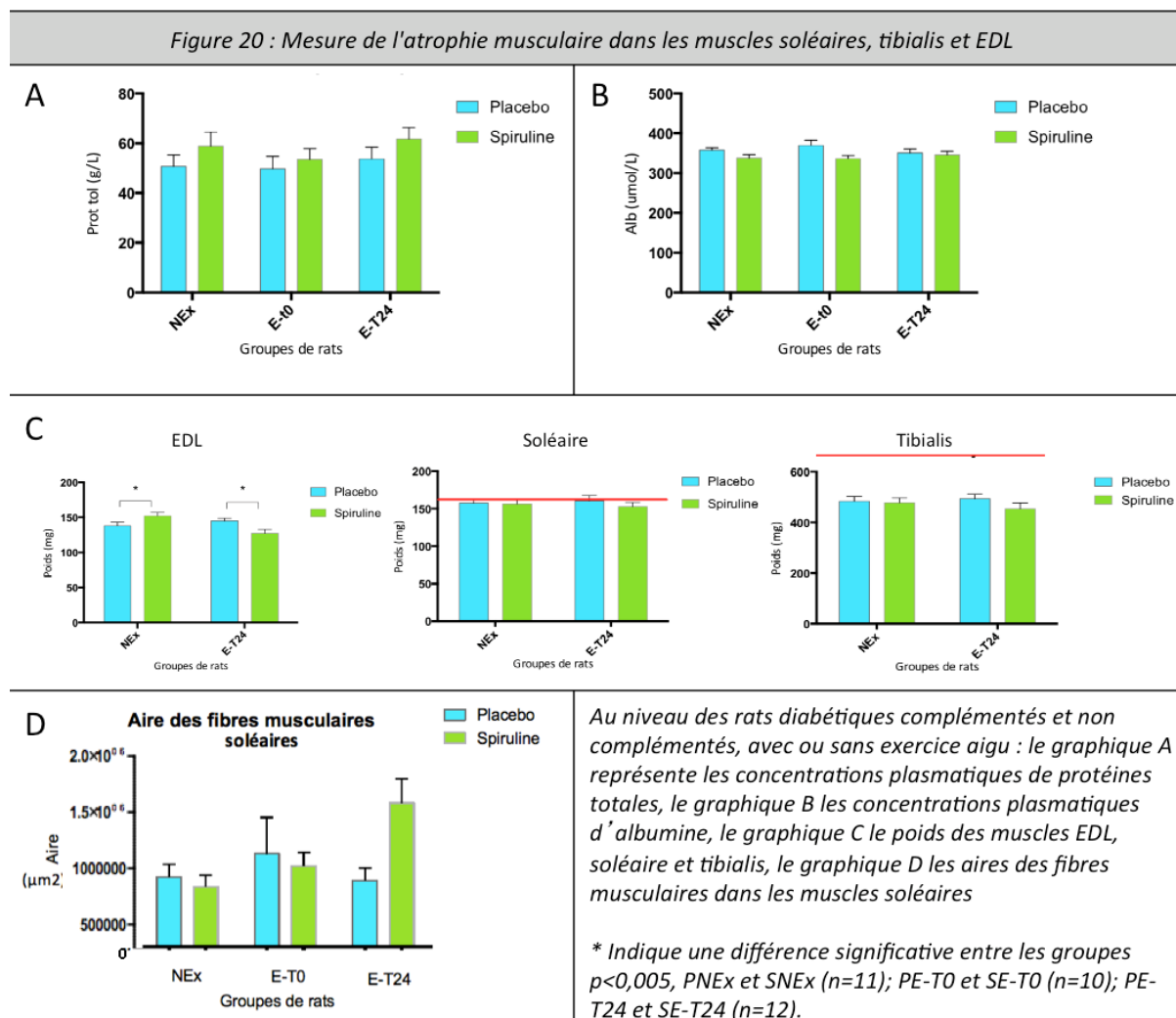


### 3- Effets de la spiruline et/ou de l'exercice sur la balance protéique, la masse musculaire et la surface de section des fibres musculaires

Dans le modèle STZ, les masses musculaires des rats diabétiques sont inférieures à ceux des rats sains décrits dans la littérature (Trait rouge). Même si les résultats ne sont pas significatifs entre les rats complémentés et non complémentés, la prise de spiruline tend à élever le poids des muscles, notamment pour l'EDL (Figure 20, Graphique C). Quatre semaines de complémentation en spiruline ne semblent pas suffisantes pour engendrer de tels effets. Dans le modèle STZ, les rats présentent des concentrations inférieures en protéines totales plasmatiques et en albumine (Trait rouge) par rapport à des rats sains (Cf.

Figure 20, Graphique A/B). Quatre semaines de complémentation en spiruline ne modifient pas la teneur en albumine plasmatique, mais semblent induire une augmentation du pool de protéines totales. L'exercice dommageable ne semble pas modifier significativement les taux de protéines ou d'albumine, que les animaux soient complémentés ou pas en spiruline.

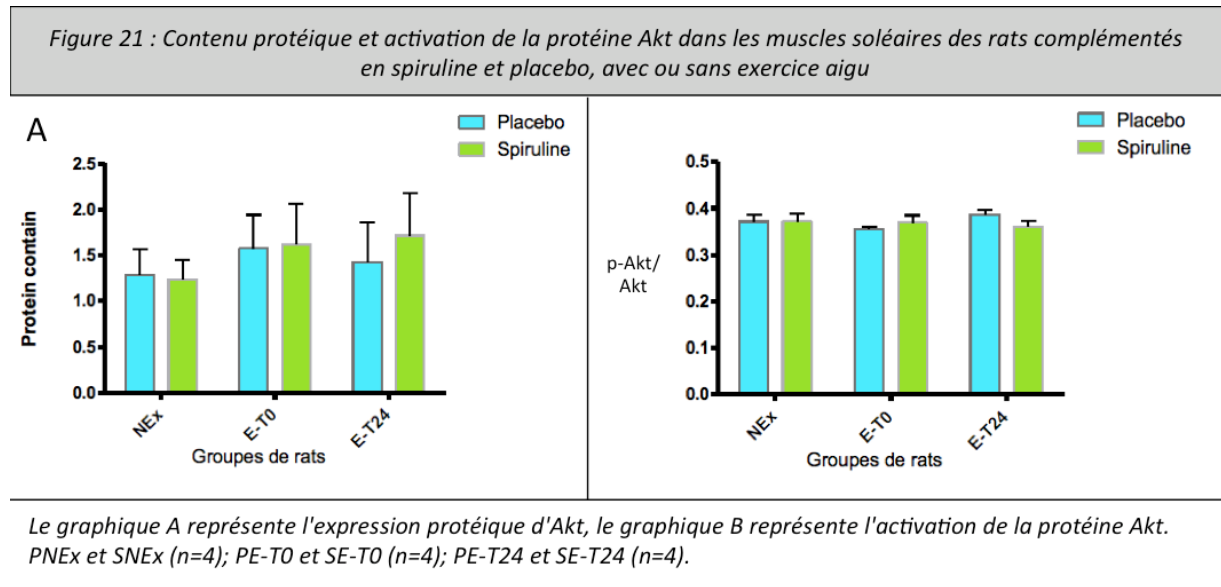
Dans le modèle STZ, les rats diabétiques ont des aires des fibres musculaires (Soléaire) inférieures aux rats sains. Quatre semaines de complémentation ne semblent pas suffisantes pour induire des surfaces de section supérieures. Immédiatement à l'arrêt de l'exercice dommageable, nous n'avons pas de modification du diamètre des fibres (surface de section). Par contre, la combinaison spiruline après exercice dommageable exerce des effets positifs sur le diamètre des fibres à 24h post-exercice ( $p = 0,0506$ ) (Figure 20, Graphique D).



#### 4- Effets de la spiruline et/ou de l'exercice sur la protéosynthèse et des éléments de voie de signalisation

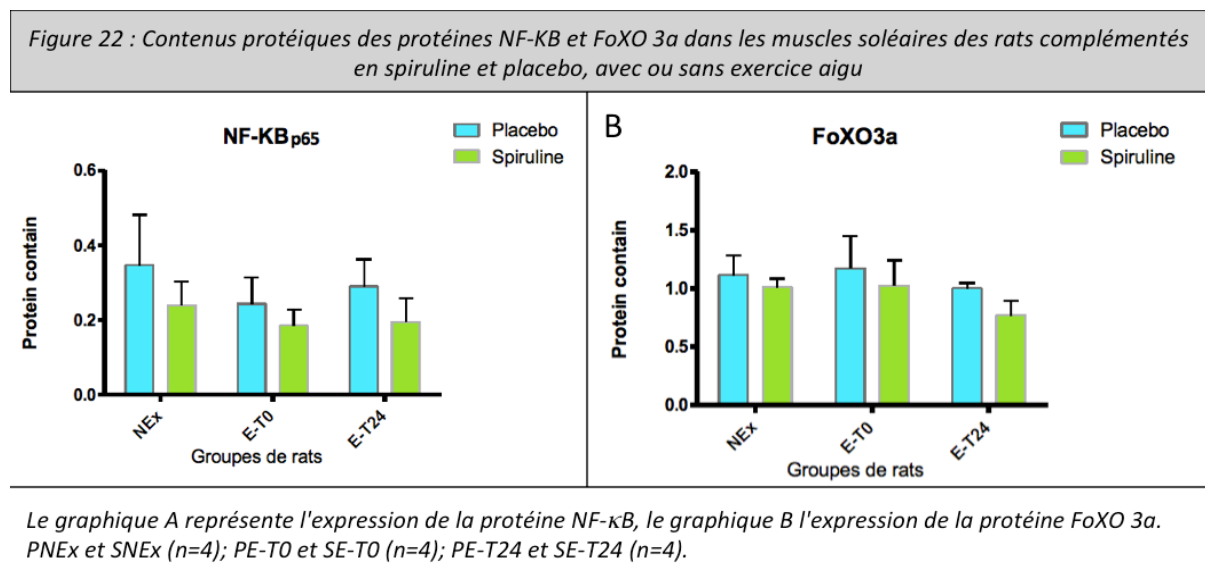
L'activation de Akt est faible dans le modèle STZ (Figure 21, Graphique B). Au regard des résultats de l'ANOVA à deux voies ( $p_{Akt} = 0,90$ ,  $p_{p-Akt} = 0,30$ ) et de la grande variabilité interindividuelle, les effets seuls de la spiruline et de l'exercice ne semblent pas impacter sur

l'expression et l'activation de la protéine Akt. Cependant la combinaison spiruline/exercice augmenterait légèrement l'expression de Akt (*Figure 21, Graphique A*).



## 5- Effets de la spiruline et/ou de l'exercice sur la protéolyse et son activation *via* la voie inflammatoire

L'analyse de l'expression et de l'activation des protéines suivantes met en évidence les effets de la spiruline sur la dégradation protéique dans les muscles soléaires. Dans le modèle STZ, on note des contenus élevés en NF- $\kappa$ B p65. L'exercice dommageable a peu d'impact sur cette protéine quel que soit le groupe. Néanmoins, chez les rats complémentés dans l'ensemble, la prise de spiruline tend à diminuer NF- $\kappa$ B (*Figure 21, Graphique A*). L'exercice dommageable a peu d'effet sur l'expression de FoXO 3a. Par contre la spiruline tend à diminuer l'expression de cette protéine dans le modèle STZ et en réponse à un exercice inhabituel, bien que ce ne soit pas significatif (*Figure 21, Graphique B*).



## 6- Effets de la spiruline et/ou de l'exercice sur le statut pro et antioxydant

### 6.1) Dommages oxydatifs

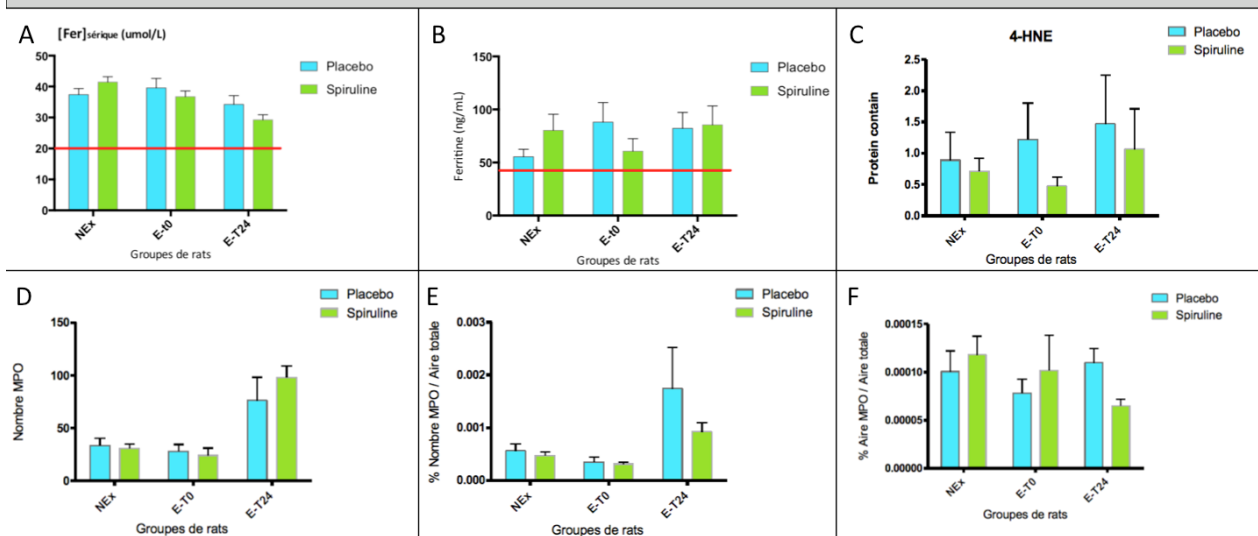
Malgré les concentrations élevées de fer et de ferritine (supérieur au trait rouge) révélant une toxicité, les effets de la spiruline et de l'exercice ne semblent pas induire de modification du statut martial, surtout chez les groupes non complémentés. Cependant, l'interaction spiruline/exercice pourrait restreindre un peu les taux de fer sérique dans les groupes complémentés à T24 (*Figure 22, Graphique A*).

Le modèle STZ présente des dommages oxydatifs, exprimé grâce au marqueur 4-HNE.

Compte tenu de la forte teneur en 4-HNE dans notre modèle, des dommages oxydatifs sont bien présents. L'exercice augmente fortement ce marqueur de la peroxydation lipidique dans les muscles soléaires. Bien que les résultats ne soient pas significatifs, on note une tendance de la spiruline à diminuer ce marqueur, notamment en réponse à l'exercice dommageable (T0 et T24) (*Figure 22, Graphique C*).

Au vue des résultats peu significatifs et des écarts types importants, les groupes sédentaires et exercice T0 ne révèlent pas les effets possibles de la spiruline et de l'exercice au niveau du marqueur témoin de la peroxydation lipidique et dommages musculaires appelé MPO (*Figure 22, Graphiques D, E et F*). À partir de T24, la combinaison spiruline/exercice aurait tendance à diminuer le marqueur MPO par rapport à l'aire totale de la coupe musculaire dans le groupe complémenté en spiruline (*Figure 22, Graphiques E et F*).

Figure 23 : Statut martial, marqueurs de la peroxydation lipidique et dommages musculaires au niveau des muscles soléaires des rats complémentés en spiruline et placebo, avec ou sans exercice aigu



Le graphique A représente les concentrations plasmatiques de fer, le graphique B les concentrations plasmatiques de ferritine, le graphique C l'expression de la protéine 4-HNE, le graphique D le nombre de MPO par rapport à l'aire totale de la coupe musculaire, le graphique E l'étendue de MPO, le graphique F la densité du signal de MPO.

PNEx et SNEx (n=11); PE-T0 et SE-T0 (n=10); PE-T24 et SE-T24 (n=12).

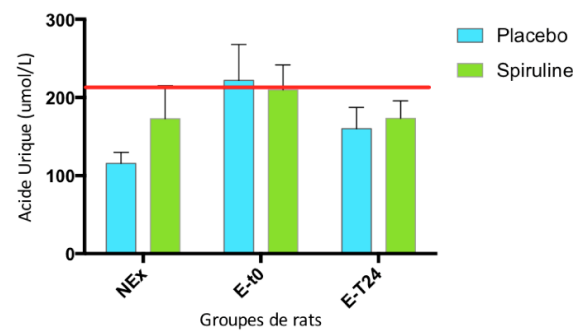
Pour les coupes musculaires : PNEx et SNEx (n=4); PE-T0 et SE-T0 (n=4); PE-T24 et SE-T24 (n=4).

Pour 4-HNE : PNEx et SNEx (n=8); PE-T0 et SE-T0 (n=8); PE-T24 et SE-T24 (n=8).

### 6.2) Statut antioxydant

Malgré les concentrations basses en acide urique (Inférieurs au trait rouge), il semble que les rats complémentés en spiruline aient des concentrations supérieures aux rats non complémentés (*Cf. Figure 23*). Les résultats de l'acide urique montrent que la combinaison spiruline-exercice ont peu d'effet sur les rats diabétiques, contrairement à la spiruline et

l'exercice seuls. Malgré tout, les deltas (Placebo : augmentation de 47,9% vs augmentation de Spiruline 16,57%) d'acide urique entre la condition non exercice et T0 semblent indiquer que l'exercice seul augmente largement ces concentrations alors que la prise de spiruline masque les effets liés à l'exercice.



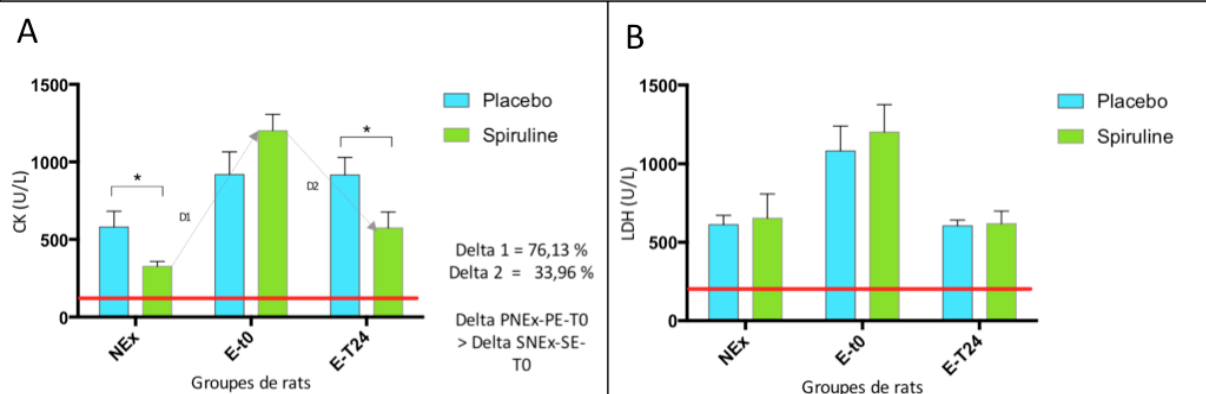
*Figure 23 : Concentrations plasmatiques d'acide urique des rats diabétiques complémentés en spiruline et placebo lors de l'exercice aigu à composante excentrique*

## 7- Effets de la spiruline et/ou de l'exercice sur les dommages musculaires et l'inflammation tissulaire

### 7.1) Dommages musculaires mesurés au niveau plasmatique

Contrairement à la population saine, le modèle STZ présente une fragilité musculaire et des dommages musculaires, qui se traduisent par une élévation importante de CK et de LDH même en l'absence d'exercice dommageable. Ces taux sont bien au dessus de la norme (Trait rouge). Quatre semaines de complémentation en spiruline, limitent les dommages musculaires comme attestent les valeurs plus faibles de CK (*Figure 24, Graphique A*). En réponse à l'exercice, dans les deux groupes, on note une élévation de CK et LDH (CK : 13,64% (P) et 76,13% (Spi), LDH : 32,63% (P) et 37,14% (Spi)). Il faut même souligner que l'augmentation de CK induite par l'exercice dommageable est plus élevée dans le groupe spiruline (Placebo 13,64% vs Spiruline 76,13%). Par contre, 24 heures post-exercice les valeurs de CK restent élevées dans le groupe placebo alors qu'elles sont retournées au niveau basale dans le groupe spiruline (Placebo -8,62% vs Spiruline : -33,96%). Ces résultats sont appuyés par les données statistiques. Les concentrations basales élevées de LDH confirment la présence de dommages dans notre modèle STZ. L'exercice réalisé engendre bien une augmentation des dommages. Par contre, ce marqueur est moins sensible aux effets positifs de la complémentation en spiruline (*Figure 24, Graphique B*).

*Figure 24 : Marqueurs de dommages musculaires au niveau plasmatique chez des rats complémentés en spiruline et placebo, avec ou sans exercice aigu*



Le graphique A représente les concentrations plasmatiques de CK, le graphique B représente les concentrations plasmatiques de LDH.

\* Indique une différence significative entre les groupes  $p < 0,05$ .

PNEx et SNEEx (n=11); PE-T0 et SE-T0 (n=10); PE-T24 et SE-T24 (n=12).

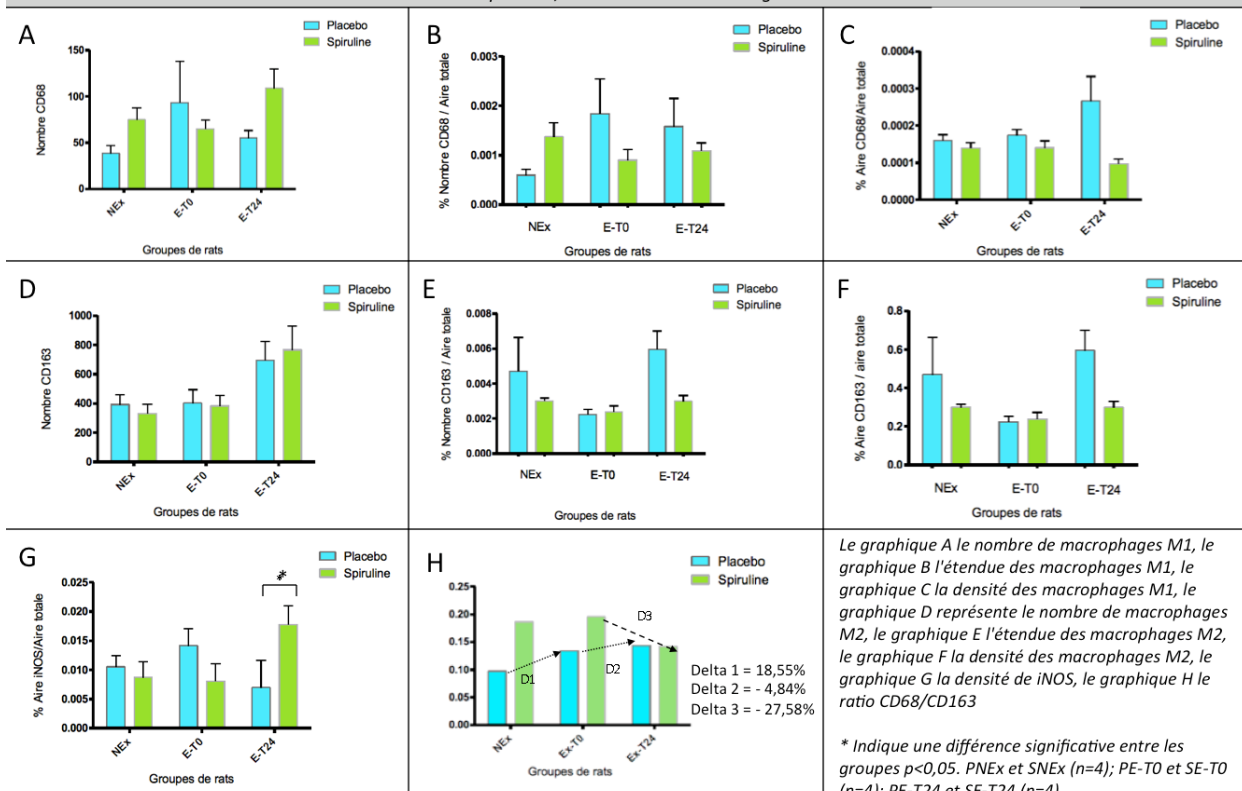


## 7.2) Marqueurs d'inflammation et de dommages musculaires

Les marqueurs CD68, iNOS et CD163 sont les témoins des macrophages M1 et M2, respectivement. Dans les conditions basales, les valeurs de marqueurs tissulaires iNOS, CD68, CD163 sont élevées. La complémentation en spiruline ne semble pas limiter les phénomènes inflammatoires et dommages au niveau musculaire dans les conditions basales. En réponse à l'exercice, la *Figure 25* montrent une légère élévation à T0, bien que ce ne soit pas significatif. Il en est de même à T24 pour CD68 quel que soit le groupe. Par contre, à T0, il n'y a pas d'augmentation de CD163 dans le groupe placebo. On note une élévation de CD163 à T24 plus importante dans le groupe spiruline lorsque les données sont exprimées en valeur absolue (*Cf. Figure 25, Graphique A*). Par contre, dès lors où l'on ramène les données en intensité de signal, ces valeurs deviennent inférieures dans le groupe spiruline (*Cf. Figure 25, Graphiques B et C*). Ces résultats sont renforcés par les données représentées sur le *Graphique H* indiquant le ratio CD68/CD163. Le *Graphique H* expose l'évolution des populations des macrophages (M1 et M2). Dans les groupes sédentaires et à exercice T0, les rats complétementés expriment davantage des macrophages de type M1. Tandis qu'à T24, bien que les groupes complétementés ou non expriment tout deux autant de macrophages M1 et M2, le groupe complétementé présente une diminution du ratio CD68/CD163 (Baisse de 27,58%) alors que le ratio CD68/CD163 du groupe placebo reste élevé.

La complémentation de quatre semaines en spiruline ne modifie pas les valeurs basales de iNOS. Même si l'exercice semble induire une légère augmentation de sa valeur à T0 dans le groupe placebo, cela n'est pas significatif. Les valeurs restent similaires à T24 dans le groupe placebo. Pour le groupe spiruline, les valeurs d'iNOS augmentent très largement à T24 (*Cf. Figure 25, Graphique G*).

Figure 25 : Marqueurs des macrophages M1 (CD68) et M2 (CD163) dans les muscles soléaires chez des rats complétementés en spiruline et placebo, avec ou sans exercice aigu



## DISCUSSION

---

Dans cette étude, l'objectif était de déterminer les effets de la spiruline sur la masse musculaire, la balance protéique et les dommages induits par un exercice à composante excentrique chez des rats diabétiques (modèle STZ). À notre connaissance, cette étude montre pour la première fois que la complémentation de 4 semaines en spiruline à raison de 300 mg/kg/jour pourrait limiter l'atrophie musculaire et modifier la surface de section des fibres. Ces mécanismes passeraient par une limitation de la protéolyse en lien avec des mécanismes anti-inflammatoires et/ou antioxydants. De plus, une telle complémentation limiterait les dommages musculaires induits par l'exercice à dominante excentrique à 24h post-exercice. Les mécanismes en lien avec la réponse inflammatoire et l'activation des différentes populations macrophagiques restent à éclaircir.

### Chapitre 1 : Validation du modèle diabétique

---

Les valeurs élevées de glycémie, de glucose et de fructosamine sont liées à une destruction incomplète des cellules sécrétrices de l'insuline. Compte tenu de la dose utilisée de STZ, la destruction des cellules  $\beta$  est incomplète (attestée par la présence d'insuline résiduelle au niveau plasmatique, lors d'une précédente étude interne au laboratoire (projet FOODIE) utilisant strictement le même modèle animal). Il induit également un état pro-inflammatoire (attesté par les valeurs plasmatiques de TNF $\alpha$  des animaux de FOODIE) et des dommages oxydatifs (concentrations élevées de CML du même projet). Ces données sont en accord avec celles de la littérature (Diab et al, 2015-Rashid et al, 2015-Akbarzadeh et al, 2007).

### Chapitre 2 : Effets de la complémentation en spiruline sur la glycémie et le contrôle glycémique

---

Malgré son activité hypoglycémique *via* la C-PC, la complémentation en spiruline ne semble pas diminuer l'hyperglycémie et améliorer le contrôle glycémique des rats diabétiques dans cette étude. Quatre de semaine de complémentation ne seraient pas suffisante pour diminuer la glycémie et la fructosamine. Dans la littérature, huit semaines de complémentation permettraient de contrecarrer certains effets de la STZ et donc d'améliorer le contrôle glycémique à court et long terme (Deng & Chow, 2010).

### Chapitre 3 : Effets de la complémentation en spiruline sur la masse corporelle, la balance protéique et les dommages oxydatifs, musculaires

---

#### 1- Effet de la spiruline sur la masse corporelle, la masse musculaire, la surface de section et les mécanismes

L'évolution de la masse corporelle est similaire aux données de la littérature. L'augmentation de la masse corporelle révèle les adaptations métaboliques des rats, mais ne compense pas les désordres métaboliques au niveau de la glycémie, des triglycérides et du cholestérol (Akbarzadeh et al, 2007). Malgré la stabilisation de la masse corporelle, quatre semaines de complémentation en spiruline ne semblent pas suffisantes pour induire une

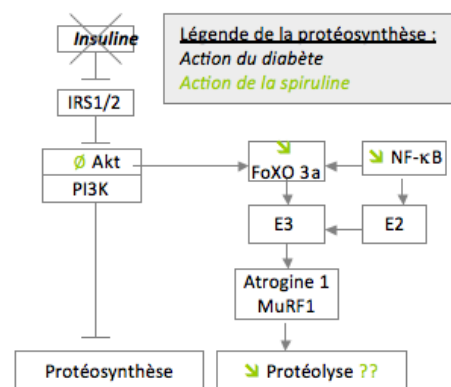
augmentation de la masse corporelle. Ces résultats s'expliquent en partie par une prise alimentaire relativement similaire entre nos deux groupes (placebo et spiruline). Le suivi des évolutions des masses grasses et musculaires seraient judicieuses pour expliquer les résultats de la masse corporelle.

Si l'on compare aux valeurs de masse musculaire et aux valeurs des surfaces de sections des fibres musculaires retrouvées chez des rats sains dans la littérature, on observe que nos animaux présentent une atrophie musculaire (SOL < 156,8 mg, TIB < 645,8 mg) (Chinedum et al, 2014-Jerković et al, 2009-Acevedo et al, 2017). Même si les résultats ne sont pas significatifs entre les rats complémentés et non complémentés, grâce à sa richesse protéique, la spiruline semble jouer un rôle positif sur la masse musculaire dès 4 semaines pour certains muscles (SOL) (Figure 20, Graphique C). Mais les surfaces de section des fibres solaires similaires dans les deux groupes appuient que quatre semaines de complémentation en spiruline ne semblent pas suffisantes pour engendrer de tels effets pour tous les types de muscles (soléaire, tibialis). Il aurait été intéressant d'étudier la surface de section des EDL. À ce jour, aucune étude n'a traité des effets de la spiruline sur la masse musculaire de rats diabétiques. Il n'est pas possible de comparer ces données à celles de la littérature.

Grâce à sa richesse protéique, la complémentation augmente naturellement le pool total des protéines plasmatiques mais sans modifier le taux d'albumine. Cela indique que le pool des autres protéines de plus petites tailles est augmenté. Cette augmentation des protéines plasmatique pourrait permettre d'avoir un pool disponible pour le muscle de manière à activer la protéosynthèse. Cette protéosynthèse est dépendante également du signal insulinique et/ou IGF-1 et de la voie de signalisation Akt/PI3K, mTOR. Or, dans la littérature, le modèle STZ montre une atrophie musculaire, notamment *via* la baisse de la voie insulinique avec l'inhibition de Akt-PI3K (Perry et al, 2016-Nicolau et al, 2016-Stefanetti et al, 2014). La prise de spiruline de 4 semaines ne permet pas d'améliorer cette voie de signalisation dans les conditions basales (Cf Figure 21). Il nous est difficile de conclure en l'absence de données concernant mTOR (en cours d'analyse). Certaines AA (leucine) étant connues dans la littérature pour activer mTOR sans signal insulinique (Mosoni, 2014).

La masse musculaire est régulée par une balance entre la protéolyse et la protéosynthèse. Or, dans le modèle diabétique STZ, l'atrophie est essentiellement due à une suractivation de la protéolyse (Perry et al, 2016). Cette voie est sous la dépendance de FoXO en particulier. Or la voie de signalisation Akt/PI3K régule l'activité transcriptionnelle des FoXO. La baisse de la phosphorylation de Akt favorise la transcription des gènes codant pour la protéine FoXO 3a, via l'action des cytokines pro-inflammatoires et des céramides chez les diabétiques. La phosphorylation de FoXO 3a induit une cascade d'action menant à l'augmentation de la protéolyse. Dans le modèle STZ, l'expression de FoXO 3a est supérieure à une population saine (Perry et al, 2016). Dans notre modèle, la spiruline tend à diminuer FoXO 3a (n=4 animaux) et l'expression d'une protéine bien connue pour activer FoXO 3a et la protéolyse : NF-κB p65.

L'expression élevée de la protéine NF-κB p65 décrite chez les diabétiques est présente dans ce modèle STZ (Rigamonti et al, 2013-Perry et al, 2016). En effet, Chen & Kotani (2016) montre aussi que la spiruline via son composé actif appelé ASTX pourrait diminuer l'expression de NF-κB. Or la voie



de signalisation NF-κB/FoXO 1/3a active l'ubiquitine ligase E3 puis les protéines MuRF1 et atrogine 1, sont connues pour stimuler la protéolyse (Perry et al, 2016). La complémentation en spiruline, en inhibant ces protéines, pourrait alors diminuer la protéolyse mais pas l'inhiber totalement (Fabricio & Maria, 2008), tels que dans la *Figure 26* :

*Figure 26 : Effets de 4 semaines de complémentation en spiruline au niveau des voies de protéosynthèse et de protéolyse chez des rats diabétiques*

## 2- Effet de la spiruline sur les dommages oxydatifs et musculaires

Grâce à la richesse en fer très hautement assimilable de la spiruline, il convient de vérifier le niveau de fer et de sa forme de stockage au niveau plasmatique. En effet, le modèle STZ est aussi un modèle de surcharge ferrique et donc pourvoyeur de SO. Les rats STZ présentent des valeurs de sidérémie et de ferritine supérieures aux rats sains (fer > 18-19 μmol/L et ferritine > 42,8 μg/mL) (Chen et al, 2015). Ce que nous retrouvons dans notre étude. La complémentation en spiruline de 4 semaines n'augmente pas le fer sérique et les concentrations plasmatiques en ferritine. De plus, la complémentation ne modifie pas des marqueurs de dommages oxydatifs liés à la peroxydation lipidique tels que 4-HNE et MPO.

Les analyses en cours des vitamines (β carotène, E, certaines du groupe B), des minéraux AO (Zn, Mn, Cu<sup>2+</sup>, Se) et de l'activité d'enzymes AO comme la SOD, GPx ou encore du rapport GSH/GSSG montreront ou non l'impact des propriétés antioxydantes de la spiruline chez des rats diabétiques. Car d'après la littérature, une supplémentation de trois semaines en spiruline diminue les marqueurs du stress oxydant (Deng et Chow, 2010). Malgré les concentrations relativement basses d'acide urique par rapport aux animaux sains de la littérature (Inférieures à 210 μmol/L), la spiruline semblerait augmenter ces concentrations. Augmenter l'acide urique permet de baisser la voie de la XO, qui favorise le SO (Bonfont-Rousselot et al, 2004). Donc la spiruline participerait à cette réaction :  
 Hypoxanthine — XO → Xanthine + 2O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O — XO → Acide urique + 2°O<sub>2</sub><sup>-</sup> + 2H<sup>+</sup>.

À cause de la forte activation de la protéolyse et la baisse de la protéosynthèse, les fibres musculaires d'animaux diabétiques sont plus endommagées (Perry et al, 2016; Acevedo et al, 2017). Ceci est en accord avec notre étude comme en témoignent les valeurs plasmatiques particulièrement élevées de CK et LDH. Comme décrit dans la littérature (Lu et al, 2006), 4 semaines de complémentation en spiruline préviendrait des dommages musculaires dans les conditions basales (données de CK *Figure 24,A*).

Au niveau musculaire, les marqueurs de dommages musculaires CD68, iNOS et CD163 sont les témoins des macrophages M1 et M2, respectivement. Dans les conditions basales, les valeurs des marqueurs tissulaires iNOS, CD68, CD163 sont élevées ce qui va de paire avec ce qui est décrit pour CK et LDH dans le modèle STZ. La complémentation en spiruline ne semble pas limiter les phénomènes inflammatoires et dommages au niveau musculaire dans les conditions basales. Ce résultat n'était pas celui attendu.

iNOS est impliquée dans l'oxydation des lipides et des acides nucléiques *via* la réaction chimique : L-Arginine — iNOS → Citrulline + °NO. Étant fortement exprimé *via* NF-κB, ce marqueur révèle l'infiltration des macrophages M1 dans les fibres musculaires lésées après l'induction de lésions tissulaires chez les diabétiques (Bentzinger et al, 2013). La

spiruline grâce ses composés actifs (C-PC et  $\beta$ -Carotène) est connue pour diminuer le médiateur iNOS (Chen & Kotani, 2016- Estrada et al, 2001- Janina et al, 2016). Quatre semaines de complémentation ne seraient pas suffisantes pour affaiblir ce marqueur témoin des dommages musculaires et de l'inflammation tissulaire.

#### Chapitre 4 : Effets de l'exercice dommageable sur la balance protéique et les dommages oxydatifs, musculaires

---

Le temps de course réalisé par les rats diabétiques placebo était de  $67 \pm 31$  minutes lors de l'exercice dommageable. En réponse à cet exercice, il n'y a pas de modification du diamètre des fibres. La voie de signalisation impliquant Akt ne montre pas d'effet de cet exercice. Cependant, l'absence de données concernant mTOR ne nous permette pas à l'heure actuelle de préciser les effets de l'exercice dommageable sur la protéosynthèse. Cet exercice dommageable réalisé a peu d'effet sur l'expression de NF- $\kappa$ B et de FoXO 3a. Ceci mériterait d'être confirmé sur un nombre d'animaux plus important. En effet, dans la littérature, les animaux diabétiques qui réalisent un exercice dommageable ont une élévation immédiatement à l'arrêt de MuRF1, Atrogine 1 et NF- $\kappa$ B malgré la diminution du système ubiquitine-protéasome (Perry et al, 2016) et donc une activation massive de la dégradation protéique (Perry et al, 2016-Stefanetti et al, 2014). L'évolution de FoXO après l'exercice aigu excentrique reste à être étudié chez les sujets diabétiques. Parallèlement les cytokines (IL6, IL8, IL15..) et les chimiokines (MCP1) augmentent fortement (Teixeira de Lemos et al, 2012). Nos analyses concernant les marqueurs de l'inflammation en réponse à l'exercice sont en cours.

Dans cette étude, l'exercice dommageable augmente fortement le marqueur de peroxydation lipidique (*Figure 22,C*) immédiatement à l'arrêt et 24h post-exercice, tout comme on peut noter une légère augmentation de iNOS pour ces mêmes temps et MPO à 24h post-exercice. Ces données sont en accord avec d'autres données de la littérature concernant des marqueurs tels que iNOS et MPO chez des rats diabétiques (Teixeira de Lemos et al, 2012). Ceci contribue également à stimuler les phénomènes en lien avec la protéolyse vu précédemment. Pour faire face à une probable élévation des RL dans ce contexte d'exercice, il n'est pas surprenant d'observer une augmentation des systèmes anti-oxydants (ici limités aux données concernant l'acide urique).

Pour ce temps d'exercice dommageable, il est normal de montrer une forte élévation de CK et LDH au niveau plasmatique, de CD68 (macrophage M1) au niveau musculaire, témoignant tous deux d'une augmentation importante des dommages musculaires. Le niveau de CD163 (macrophage M2) reste inchangé à T0 et augmente très fortement à T24. En conséquence le ratio CD68/CD163 reste très élevé dans le groupe placebo. Ceci est en faveur d'une présence forte de macrophage M1 et d'une phase pro-inflammatoire importante. Cette phase a tendance à perdurer dans ce groupe placebo. Ces données sont en accord avec la littérature concernant CD68 et CD163 et la perturbation de la phase pro-inflammatoire dans un contexte pathologique et/ou dommageable mais pas forcément post exercice (Fabriek et al, 2005- Le Moal, 2015). L'utilisation du ratio CD68/CD163 pour témoigner du changement de phénotype chez des animaux diabétiques est assez novateur en réponse à l'exercice.

## Chapitre 5 : Effets de la complémentation en spiruline avec l'exercice dommageable sur la balance protéique et les dommages oxydatifs, musculaires

---

Le temps de course réalisé par les animaux complémenté est de  $75,1 \pm 48,4$  minutes. Ceci est en faveur d'une durée d'exercice supérieure avec la prise de spiruline. Cette étude montre pour la première fois que 4 semaines de complémentation en spiruline peuvent améliorer la performance lors d'un exercice épuisant en descente chez des rats diabétiques STZ. Une étude sur l'homme (sportif) montre aussi lors d'un sprint à 95% de leur  $VO_2\text{max}$  un temps d'épuisement plus faible (Manet, 2016).

En réponse à l'exercice dommageable, notre étude rapporte une augmentation de la surface de section des rats diabétiques complémentés en spiruline à T24 ( $p=0,0506$ ). Cela serait en faveur d'une potentielle hypertrophie. Cette hypertrophie devrait être en faveur d'une augmentation de la protéosynthèse qui deviendrait supérieure à la protéolyse.

Des éléments semblent aller dans ce sens. En effet, la spiruline augmenterait légèrement l'expression protéique d'Akt après un exercice dommageable. Nous pourrions supposer que l'inhibition de mTOR serait levée, et que la voie de signalisation insulinique (IRS1/Akt/PI3K) serait stimulée. Des analyses futures sur les protéines mTOR, IRS1 et AS160 seront effectuées afin de mieux étayer cette hypothèse. La complémentation en spiruline aurait tendance également à diminuer NF- $\kappa$ B et de FoXO 3a en réponse à l'exercice dommageable à T24. Ainsi la spiruline pourrait réduire les facteurs d'activation de la protéolyse après un exercice dommageable. L'étude des cytokines pro inflammatoires (CRP, TNF $\alpha$ , IL6) serait intéressante pour mettre en exergue les propriétés anti-inflammatoires de la spiruline dans ce contexte post-exercice. Ces cytokines et les céramides stimulant la protéine NF- $\kappa$ B. Ce qui est décrit dans la littérature concerne plutôt la protéolyse limitée par la prise de spiruline (Fabricio & Maria, 2008). Il est possible que cela soit en lien avec composé actif appelé ASTX (Chen & Kotani, 2016). Ces données seront à compléter par la mesure d'autres marqueurs mais sont assez nouvelles dans ce domaine en ce qui concerne NF- $\kappa$ B et de FoXO 3a en réponse à l'exercice. L'étude de nouveaux marqueurs comme les cytokines pro-inflammatoires, des protéines des voies de signalisation de la protéolyse (Protéines ubiquités, MuRF1), de la synthèse protéique (mTOR), de l'inflammation (COX-2, IKK $\alpha/\beta$ ) et de l'insuline (IRS1, insuline) pourrait approfondir la compréhension des mécanismes.

Si la masse musculaire est préservée en partie dans ce modèle complémenté en spiruline, les dommages induits par l'exercice devraient être plus limités. En ce qui concerne les dommages oxydatifs, chez les rats diabétiques soumis à cet exercice épuisant en descente, la spiruline pourrait aider à stimuler un système antioxydant (Acide urique) (Chez l'homme : Manet, 2016), à abaisser les marqueurs de peroxydation lipidique (4-HNE, MPO) *via* ses composés ( $\beta$ -carotène, ASTX, C-PC, flavonoïdes, GSH, Zn/Se) et de source de stress oxydant (fer) *via* la C-PC. Dans notre étude, la complémentation en spiruline tend à baisser les marqueurs de peroxydation lipidique comme 4-HNE et la densité du signal des MPO infiltrés dans les soléaire en réponse à l'exercice dommageable. De plus, elle aurait tendance à limiter la surcharge en fer.

En ce qui concerne les dommages musculaires induits par l'exercice, il faut souligner que l'exercice dommageable induit immédiatement à l'arrêt (T0) une élévation aussi

importante des concentrations de CK plasmatiques chez les animaux complémentés en spiruline que chez les non complémentés, alors même que les temps d'exercice sont supérieurs. De plus, les concentrations de CK plasmatiques retournent presque à leurs valeurs basales chez 24h post-exercice pour les animaux complémentés en spiruline (diminution de 34 %) alors qu'elles restent au même niveau (valeur élevée) pour les non complémentés (diminution de 8%). La spiruline préviendrait des dommages musculaires (Lu et al, 2006) si l'on rapporte les valeurs de CK à la même durée d'exercice. Ces résultats sont intéressants surtout après un exercice dommageable. En général, l'augmentation des concentrations de CK apparaît dès l'arrêt de l'exercice augmente à 24h pour atteindre un pic sous à 3-6 jours (Schiaffino et al, 2008). Il semble ici que la spiruline exerce des effets protecteurs vis-à-vis des structures musculaires en limitant les dommages notamment en diminuant les valeurs de CK. Ces résultats renforcent les données de la littérature (Chinedum et al, 2014) et les complètent en réponse à l'exercice dommageable chez le rat (Chez l'homme : Manet, 2016).

De plus, chez les diabétiques, l'hyperglycémie amplifie les dommages musculaires (Bernard Catherine et al, 2013). En effet, la formation de céramides altère la voie de l'insuline en réduisant la phosphorylation de Akt et activera les voies inflammatoires (ARA-COX2). Cette altération de la voie insulinique (IR) provoquera la dégradation des acides aminés dans les tissus musculaires (Joffrey De Larichaudy, 2012). Toutefois, aucun marqueur de l'activation de la voie des céramides ne prouve ces processus. Comme une complémentation de 4 semaines ne limite pas d'hyperglycémie, elle ne peut contribuer à l'inhibition des dommages musculaires par ce biais.

Au niveau musculaire, les rats complémentés expriment principalement une population de macrophages M1 (CD68) dans les conditions basales. Après l'exercice dommageable (à T24), les rats complémentés disposent plus de macrophages M2 (CD163) en nombre. Mais surtout si l'on compare ces données aux animaux non complémentés, on observe une différence de ratio M1/M2 (CD68/CD63). Ces résultats témoignent du changement de phénotype : des macrophages pro-inflammatoires en macrophages anti-inflammatoires (à T24). Alors la spiruline faciliterait la venue des macrophages M2 et donc la formation de nouveaux tissus musculaires. Chez les diabétiques, la régénération musculaire est perturbée à cause de la mise en route tardive de la phase inflammatoire. L'amplification de la phase inflammatoire engendre la suppression de la protéine CD163 par les médiateurs pro-inflammatoires (Le Moal, 2015-Schiaffino et al, 2008-Fabriek et al, 2005). Ce qui pourrait être le cas notre étude dans le groupe non complémenté en réponse à l'exercice. Pour le groupe complémenté, on aurait un changement de phénotype avec un phénomène plus précoce favorable à la régénération. Malgré le peu de littérature sur l'effet de la spiruline sur les marqueurs CD68 et CD163 dans les tissus musculaires chez des rats, nous pouvons penser que la spiruline pourrait jouer un rôle favorable dans la régénération musculaire après un exercice dommageable. Cela reste très hypothétique.

De plus, les données concernant iNOS et MPO semblent contradictoires avec une augmentation à T24 post-exercice dans le groupe complémenté relativement élevé pour iNOS. Cela semble difficile à interpréter.

## LIMITES ET PERSPECTIVES

---

Malgré le manque de littérature sur les effets de la spiruline au niveau de l'atrophie musculaire, des dommages musculaires et de la balance protéique, il semblerait que la complémentation en spiruline de quatre semaines aurait globalement un effet positif sur les dommages musculaires. Mais nous ne pouvons pas conclure, car l'impact de la spiruline sur les voies de signalisation sont des déductions compte tenu des résultats parcellaires des protéines impliquées et/ou activées. L'analyse complémentaire d'autres marqueurs musculaires serait intéressante pour étayer ces hypothèses après un exercice dommageable, notamment au niveau des voies de signalisation de la protéolyse (Protéines ubiquitinées, MuRF1), de la protéosynthèse (mTOR), de l'insuline et du transport du glucose (IRS1/2, PI3K, GLUT4, AS160), de l'inflammation (TNF $\alpha$ , ILs, CRP, IKK $\alpha/\beta$ ), des dommages musculaires (COX-2) et des systèmes pro/antioxydants (CAT, SOD, GPx, GSH, Vitamines/Minéraux antioxydants, CML). Certains de ces marqueurs sont en cours d'analyse.

Une autre étude parallèle avec 8 semaines de complémentation en spiruline semble déjà prometteuse en ce qui concerne les effets positifs sur la masse corporelle et des différents muscles. Ceci pourrait sous-entendre les effets positifs de la spiruline sur la balance protéique et la surface de section des fibres. La protéosynthèse serait stimulée et les facteurs d'activation de la protéolyse seraient abaissés, provoquant une hypertrophie musculaire.

L'analyse des dommages musculaires plusieurs jours après un exercice dommageable se révélerait profitable afin de remarquer l'impact de la spiruline sur la récupération musculaire. Certains marqueurs ont leur pic d'expression plus tardive en général : CK à 3-4 jours, iNOS/CD68 à 2-3 jours, CD163 à 3-4 jours chez les sujets sains (Bentzinger et al, 2013; Rigamonti et al, 2013). Les cinétiques de ces marqueurs dans le modèle STZ restent à déterminer. Ainsi son impact sur la régénération musculaire pourrait être mis en avant dans les différentes phases.

Pour augmenter le niveau de significativité des résultats, l'augmentation du nombre d'échantillons dans chaque groupe accroîtrait la puissance des tests statistiques. Il conviendrait d'augmenter le nombre d'animaux par groupe dans les analyses de type Western Blot. La mise en place d'un groupe contrôle pourrait être bénéfique pour comparer l'efficacité de la complémentation en spiruline avant et après, pour vérifier la présence des dysfonctionnements insuliniques, d'atrophie musculaire (masse des muscles), de stress oxydant (marqueurs pro-oxydant)... En outre, d'après l'analyse sur coupe histologique, la faible qualité de certaines coupes musculaires pourrait être perçue comme un biais. Certaines de ces coupes n'ont pas pu être analysées correctement et certaines ont même été refaites.

Après un exercice physique, la régénération musculaire est indispensable à la récupération musculaire. Cependant, ces diverses altérations (Inflammation, stress oxydant, dommages musculaires) sont aussi retrouvées chez les sportifs après un exercice physique. En plus d'améliorer les performances d'endurance et de force musculaire, la spiruline influencerait de manière positive la récupération musculaire, en limitant les dommages musculaires dus à un exercice dommageable (notamment excentrique) (Braakhuis et al, 2015). Cette complémentation porte un intérêt particulier dans des modèles cliniques (Diabète) et surtout dans des modèles sportifs. La récupération musculaire est un facteur clé de la performance chez les sportifs soumis à des épreuves répétées. Les études portant sur



les stratégies de récupération musculaire contribuent à l'exploration et/ou l'approfondissement des connaissances sur les réponses adaptatives des muscles face à un exercice physique et sur la récupération.

## **CONCLUSION**

---

L'hypothèse avancée était que la spiruline pourrait diminuer les dommages musculaires induits par le diabète et par un exercice dommageable chez des rats, *via* ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, insulino-sensibilisantes et grâce à son rôle bénéfique au niveau de la protéosynthèse. La courte durée de complémentation ne permet pas d'avancer que la spiruline joue un rôle majeur dans la limitation des dommages induits par le diabète. Néanmoins, la spiruline semblerait diminuer les dommages musculaires induits par un exercice de type excentrique dans ce modèle. Cela pourrait en partie s'expliquer par une régulation positive sur les cellules musculaires *via* une balance protéique moins négative (à confirmer avec l'activation de la protéosynthèse et la diminution de la protéolyse). Cela reste à vérifier. De même ces effets pourraient s'exercer *via* des effets antioxydants et anti-inflammatoire qui sont à compléter. Ainsi nous pouvons supposer que la spiruline pourrait jouer un rôle dans la récupération musculaire. Les résultats semblent être prometteurs.

Le manque de donnée de la littérature sur les propriétés musculaires de la spiruline ouvre un vaste champ d'exploration. Les effets de la spiruline sur la récupération musculaire demandent de plus amples investigations.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- 1- Acevedo, Luz M., Ana I. Raya, Julio M. Martínez-Moreno, Escolástico Aguilera–Tejero, and José-Luis L. Rivero. “Mangiferin Protects against Adverse Skeletal Muscle Changes and Enhances Muscle Oxidative Capacity in Obese Rats.” Edited by Andrew Philp. *PLOS ONE* 12, no. 3 (March 2, 2017): e0173028. doi:10.1371/journal.pone.0173028.
- 2- Akbarzadeh, A., D. Norouzian, M. R. Mehrabi, S. H. Jamshidi, A. Farhangi, A. Allah Verdi, S. M. A. Mofidian, and B. Lame Rad. “Induction of Diabetes by Streptozotocin in Rats.” *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 22, no. 2 (2007): 60–64.
- 3- Augusto, Valéria, Carlos Roberto Padovani, and GE Rocha Campos. “Skeletal Muscle Fiber Types in C57BL6J Mice.” *Braz J Morphol Sci* 21, no. 2 (2004): 89–94.
- 4- Bei Yao, Yuhua Zhang, Sylvie Delikat, Shalini Mathias, Subham Basu, Richard Kolesnick « Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase », *Nature*, Vol 378, 1995
- 5- Bentzinger, C Florian, Yu Xin Wang, Nicolas A Dumont, and Michael A Rudnicki. “Cellular Dynamics in the Muscle Satellite Cell Niche.” *EMBO Reports* 14, no. 12 (December 2013): 1062–72. doi:10.1038/embor.2013.182.
- 6- Bermejo, Paloma, Enrique Piñero, and Ángel M<sup>a</sup> Villar. “Iron-Chelating Ability and Antioxidant Properties of Phycocyanin Isolated from a Protean Extract of *Spirulina platensis*.” *Food Chemistry* 110, no. 2 (September 2008): 436–45. doi:10.1016/j.foodchem.2008.02.021.
- 7- Bernard, Catherine, Odile Della Zuana, and Alain Ktorza. “Interaction Entre Facteurs D’environnement et Fonds Génétique Dans Le Diabète de Type 2: L’apport Des Modèles Animaux.” *Médecine/sciences* 29, no. 8–9 (August 2013): 791–99. doi:10.1051/medsci/2013298020.
- 8- Braakhuis, Andrea J., and Will G. Hopkins. “Impact of Dietary Antioxidants on Sport Performance: A Review.” *Sports Medicine* 45, no. 7 (July 2015): 939–55. doi:10.1007/s40279-015-0323-x.
- 9- Boumaza Awatif « Effet de l’extrait méthanolique de *Zygophyllum cornutum* coss contre le stress oxydant associé au diabète sucré et les organes en relation », 2009
- 10- Chen Jui-Tung & Kotani Kazuhiko « Astaxanthin as a potential protector of liver function : a review » *Journal Clinique Medecine Res.*, 2016, 8(10), p 701-704
- 11- Chinedum Ogbonnaya Eleazu, Polycarp Nnaecheta Okafor, Ijeh Ifeoma « Biochemical basis of the use of cocyam (*Colocassia esculenta* L.) in the dietary management of diabetes and its complications in streptozotocin induced diabetes in rats », *Asian Pacifique Journal of Tropical Disease*, 2014 ; 4(Suppl 2) : S705-S711, doi :10.1016/S2222-1808(14)60711-8
- 12- Deng, Ruitang, and Te-Jin Chow. “Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*: Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*.” *Cardiovascular Therapeutics* 28, no. 4 (July 5, 2010): e33–45. doi:10.1111/j.1755-5922.2010.00200.x.
- 13- Diab, Randa A. Hadi, Mona Fares, Manuchehr Abedi-Valugerdi, Makiko Kumagai-Braesch, Jan Holgersson, and Moustapha Hassan. “Immunotoxicological Effects of Streptozotocin and Alloxan: In Vitro and in Vivo Studies.” *Immunology Letters* 163, no. 2 (February 2015): 193–98. doi:10.1016/j.imlet.2014.12.006.
- 14- D. Bonnefont-Rousselot, J-L beaudeau, P. thérond, J. Peynet, A. Legrand, J. Delattre « Diabète sucré, stress oxydant et produits de glycation avancée », *Annales Pharmaceutiques Françaises* 62, no. 3 (2004): 147–57.

- 15-** Fabriek, Babs O., Christine D. Dijkstra, and Timo K. van den Berg. "The Macrophage Scavenger Receptor CD163." *Immunobiology* 210, no. 2–4 (August 2005): 153–60. doi:10.1016/j.imbio.2005.05.010.
- 16-** Haleng, Jeanine, Joël Pincemail, Jean-Olivier Defraigne, Corinne Charlier, and Jean-Paul Chapelle. "Le Stress Oxydant." *Revue Médicale de Liège* 62, no. 10 (2007): 628–38.
- 17-** Ide, Takashi, Haruka Iwase, Saaya Amano, Saki Sunahara, Ayuka Tachihara, Minako Yagi, and Tsuyoshi Watanabe. "Physiological Effects of  $\gamma$ -Linolenic Acid and Sesamin on Hepatic Fatty Acid Synthesis and Oxidation." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 41 (March 2017): 42–55. doi:10.1016/j.jnutbio.2016.12.001.
- 18-** Janina Dose, Seiichi Matsugo, Haruka Yokokawa, Yutaro Koshida, Shigetoshi Okazaki, Ulrike Seidel, Manfred Eggersdorfer, Gerald Rimbach et Tuba Esatbeyoglu « Free radical scavenging and cellular antioxydant properties of astaxanthin », *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17, 103 ;doi :10 :3390/ijms17010103
- 19-** Jean Dupire « La spiruline un superaliment » Ed Guy Trédaniel, 2011, ISBN 978-2-8132-0215-4.
- 20-** Jerković, Romana, Alan Bosnar, Dubravka Jurišić-Eržen, Josip Ažman, Gordana Starčević-Klasan, Stanislav Peharec, and Miran Čoklo. "The Effects of Long-Term Experimental Diabetes Mellitus Type I on Skeletal Muscle Regeneration Capacity." *Collegium Antropologicum* 33, no. 4 (2009): 1115–19.
- 21-** Joffrey De Larichaudy « Implication des céramides dans l'atrophie musculaire », 2012, Sciences agricoles, INSA de Lyon
- 22-** Kassab, A., S. Laradi, S. Ferchichi, A. Omezzine, B. Charfeddine, H. Ammar, L. Chaieb, and A. Miled. "Paramètres Du Stress Oxydant Dans Le Diabète de Type 2." *Immuno-Analyse & Biologie Spécialisée* 18, no. 2 (2003): 79–85.
- 23-** Karen Geoffroy « Rôle des sphingolipides endogènes dans les modifications de la prolifération des cellules mésangiales rénales en réponse aux produits avancés de glycation (AGE) : implication dans le développement de la néphropathie diabétique », 2005
- 24-** Khalkhal, Ali, Aomar Haddar, Nesrine Semiane, Aicha Mallek, Abdelouadoud Abdelmalek, Françoise Castex, René Gross, and Yasmina Dahmani. "Obesity, Insulin Resistance and Diabetes in the Sand Rat Exposed to a Hypercaloric Diet; Possible Protective Effect for IL1- $\beta$ ." *Comptes Rendus Biologies* 335, no. 4 (April 2012): 271–78. doi:10.1016/j.crv.2012.03.003.
- 25-** Kolesnick, Richard, and David W. Golde. "The Sphingomyelin Pathway in Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 Signaling." *Cell* 77, no. 3 (1994): 325–28.
- 26-** Le Moal Emmeran « Macrophages au cours de la régénération musculaire : rôle du stress oxydant et des molécules sécrétées – De la biologie fondamentale à la physiologie intégrative », 2015
- 27-** Lee, Eun Hee, Ji-Eun Park, Young-Ju Choi, Kap-Bum Huh, and Wha-Young Kim. "A Randomized Study to Establish the Effects of Spirulina in Type 2 Diabetes Mellitus Patients." *Nutrition Research and Practice* 2, no. 4 (2008): 295–300.
- 28-** Li, Pingping, Da Young Oh, Gautam Bandyopadhyay, William S Lagakos, Saswata Talukdar, Olivia Osborn, Andrew Johnson, et al. "LTB4 Promotes Insulin Resistance in Obese Mice by Acting on Macrophages, Hepatocytes and Myocytes." *Nature Medicine*, February 23, 2015. doi:10.1038/nm.3800.
- 29-** Lu, Hsueh-Kuan, Chin-Cheng Hsieh, Jen-Jung Hsu, Yuh-Kuan Yang, and Hong-Nong Chou. "Preventive Effects of Spirulina Platensis on Skeletal Muscle Damage under Exercise-Induced Oxidative Stress." *European Journal of Applied Physiology* 98, no. 2 (September 2006): 220–26. doi:10.1007/s00421-006-0263-0.

- 30-** Audrey Manet « La spiruline : indications thérapeutiques, risques sanitaires et conseils à l'officine » Sciences pharmaceutiques. 2016. <dumas-01346709>
- 31-** Mosoni, Laurent. "Le métabolisme protéique musculaire, contrôle nutritionnel." *Nutrition Clinique et Métabolisme* 28, no. 1 (February 2014): 29–37. doi:10.1016/j.nupar.2013.12.003.
- 32-** Naomi Brooks, Jennifer E. Layne, Patricia L. Gordon, Ronenn Roubenoff, Miriam E. Nelson, Carmen Castaneda-Sceppa « Strength training improves muscle quality and insulin sensitivity in Hispanic older adults with type 2 diabetes » *International Journal Of Medical Sciences*, 2007
- 33-** Nicolau, Julia, Thierry Lequerré, Hélène Bacquet, and Olivier Vittecoq. "Rheumatoid Arthritis, Insulin Resistance, and Diabetes." *Joint Bone Spine*, October 2016. doi:10.1016/j.jbspin.2016.09.001.
- 34-** Perry, Ben D., Marissa K. Caldow, Tara C. Brennan-Speranza, Melissa Sbaraglia, George Jerums, Andrew Garnham, Chiew Wong, et al. "Muscle Atrophy in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: Roles of Inflammatory Pathways, Physical Activity and Exercise." *Exerc Immunol Rev* 22 (2016): 94–108.
- 35-** Pincemail, Joël, Karine Bonjean, Karine Cayeux, and Jean-Olivier Defraigne. "Mécanismes Physiologiques de La Défense Antioxydante." *Nutrition Clinique et Métabolisme* 16, no. 4 (2002): 233–39.
- 36-** Rana Mahfouz « Insulinorésistance musculaire induite par les céramides : étude des mécanismes d'action et de l'implication du transporteur CERT », 2015
- 37-** Reimund, Jean-Marie. "Stress Oxydant Au Cours Des Syndromes Inflammatoires Chroniques." *Nutrition Clinique et Métabolisme* 16, no. 4 (2002): 275–84.
- 38-** Rashid, Kahkashan, and Parames C. Sil. "Curcumin Enhances Recovery of Pancreatic Islets from Cellular Stress Induced Inflammation and Apoptosis in Diabetic Rats." *Toxicology and Applied Pharmacology* 282, no. 3 (February 2015): 297–310. doi:10.1016/j.taap.2014.12.003.
- 39-** Rigamonti, E., T. Touvier, E. Clementi, A. A. Manfredi, S. Brunelli, and P. Rovere-Querini. "Requirement of Inducible Nitric Oxide Synthase for Skeletal Muscle Regeneration after Acute Damage." *The Journal of Immunology* 190, no. 4 (February 15, 2013): 1767–77. doi:10.4049/jimmunol.1202903.
- 40-** Schiaffino, Stefano, and Terence Partridge, eds. *Skeletal Muscle Repair and Regeneration*. Advances in Muscle Research 3. Dordrecht: Springer, 2008.
- 41-** Shabana, Effat Fahmy, Mahmoud Ali Gabr, Helal Ragab Moussa, Enas Ali El-Shaer, and Mostafa M.S. Ismaiel. "Biochemical Composition and Antioxidant Activities of Arthrospira (Spirulina) Platensis in Response to Gamma Irradiation." *Food Chemistry* 214 (January 2017): 550–55. doi:10.1016/j.foodchem.2016.07.109.
- 42-** Sies H., Jones DP. "Oxidative Stress", 2007, Encyclopedia of stress, volume 3, 2<sup>nd</sup> edn. Elsevier, Amsterdam, p45-48
- 43-** Stefanetti, R. J., S. Lamon, S. K. Rahbek, J. Farup, E. Zacharewicz, M. A. Wallace, M. H. Vendelbo, A. P. Russell, and K. Vissing. "Influence of Divergent Exercise Contraction Mode and Whey Protein Supplementation on Atrogin-1, MuRF1, and FOXO1/3A in Human Skeletal Muscle." *Journal of Applied Physiology* 116, no. 11 (June 1, 2014): 1491–1502. doi:10.1152/jappphysiol.00136.2013.
- 44-** Teixeira de Lemos, Edite, Jorge Oliveira, João Páscoa Pinheiro, and Flávio Reis. "Regular Physical Exercise as a Strategy to Improve Antioxidant and Anti-Inflammatory Status: Benefits in Type 2 Diabetes Mellitus." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012 (2012): 1–15. doi:10.1155/2012/741545.

- 45-** Thang Sang Vo, Dai-Hung Ngo, Se-Kwon Kim « Nutritional and pharmaceutical properties of microalgal Spirulina », 2015, Chapter 19, p299-308, Handbook of Marine Microalgae, Ed. Biotechnology Advances
- 46-** Wang, L, B Pan, J Sheng, J Xu, and Q Hu. "Antioxidant Activity of Spirulina Platensis Extracts by Supercritical Carbon Dioxide Extraction." *Food Chemistry* 105, no. 1 (2007): 36–41. doi:10.1016/j.foodchem.2007.03.054.
- 47-** Wattiez, A. -S., A. Dupuis, and C. Courteix. "Le rat STZ-diabétique: modèle adapté à l'étude de la neuropathie diabétique douloureuse?" *Douleur et Analgésie* 25, no. 1 (March 2012): 38–45. doi:10.1007/s11724-012-0278-8.
- 48-** WIDED, FATMI. "L'effet de La Vitamine C et Le Sélénium Sur Le Développement de Diabète Chez Les Rats Alimentés Par Un Régime Alimentaire Carencé En Zinc." Badji Mokhtar University, 2014. <http://biblio.univ-annaba.dz/wp-content/uploads/2014/10/These-FATMI-Wided.pdf>.
- 49-** Widmaier E.P., Raff H., Strang K.T. « Physiologie humaine, les mécanismes du fonctionnement de l'organisme », 2009, Chapitre 16 « Régulation du métabolisme organique et de l'équilibre énergétique », p 664-667, Ed Maloine, ISBN : 978-0-07-128366-3
- 50-** Yang, Seung-Ju, Woo Je Lee, Eun-A Kim, Kee Dal Nam, Hoh-Gyu Hahn, Soo Young Choi, and Sung-Woo Cho. "Effects of N-Adamantyl-4-Methylthiazol-2-Amine on Hyperglycemia, Hyperlipidemia and Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats." *European Journal of Pharmacology* 736 (August 2014): 26–34. doi:10.1016/j.ejphar.2014.04.031.

Chapitre 1 : Revue de littérature

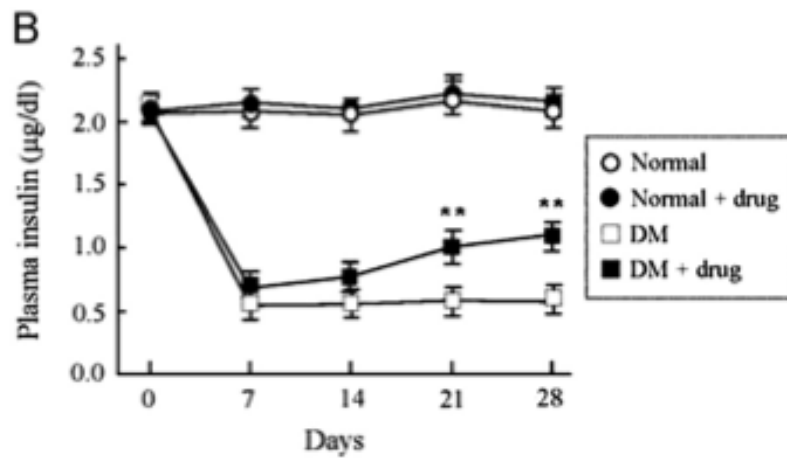


Fig. 3. (A) Effect of KHG26693 on blood glucose levels and (B) plasma insulin levels in STZ-induced diabetic rats. Data are the mean  $\pm$  S.E.M. values. \*\*Significantly different from diabetic control ( $P < 0.05$ ).

Figure 1 : Évolution de la concentration plasmatique d'insuline chez des rats sains avec ou sans traitement et diabétiques avec ou sans traitement (D'après Yang et al, 2014)

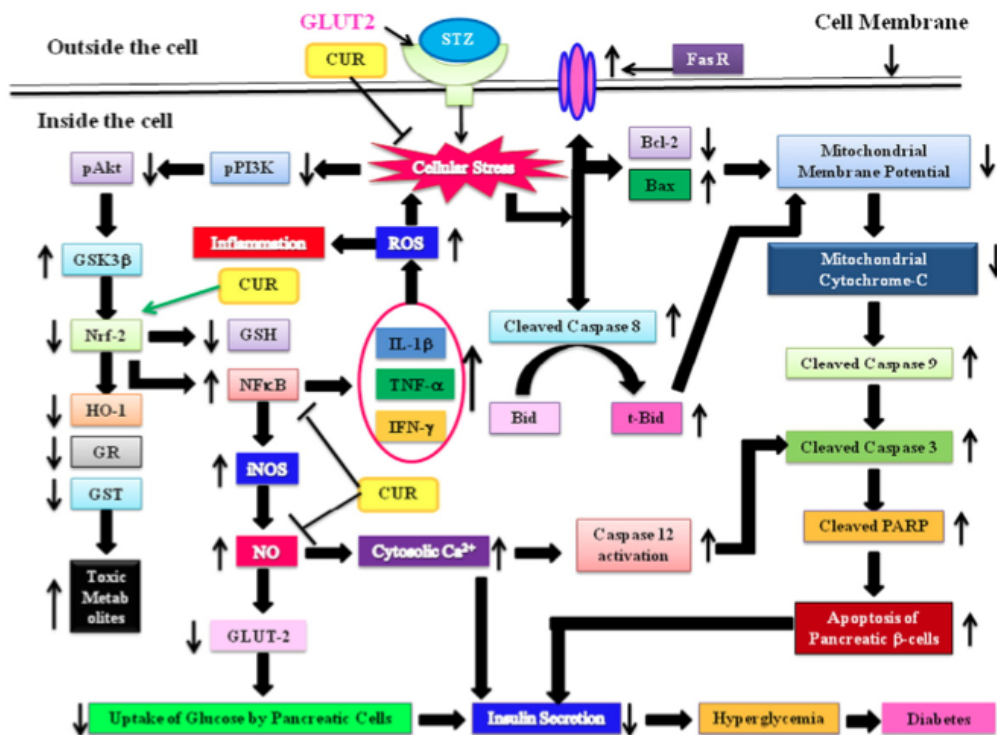
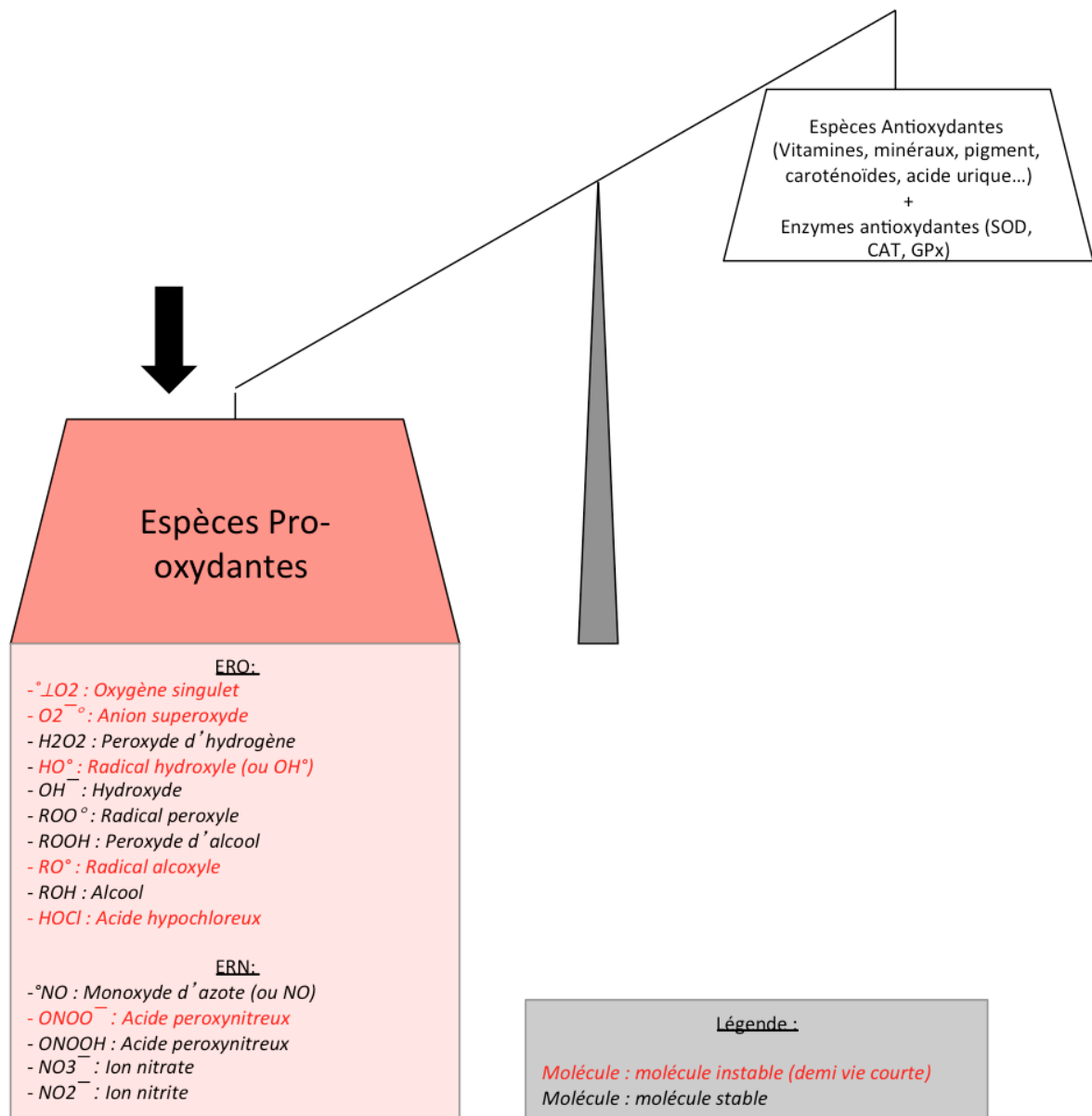
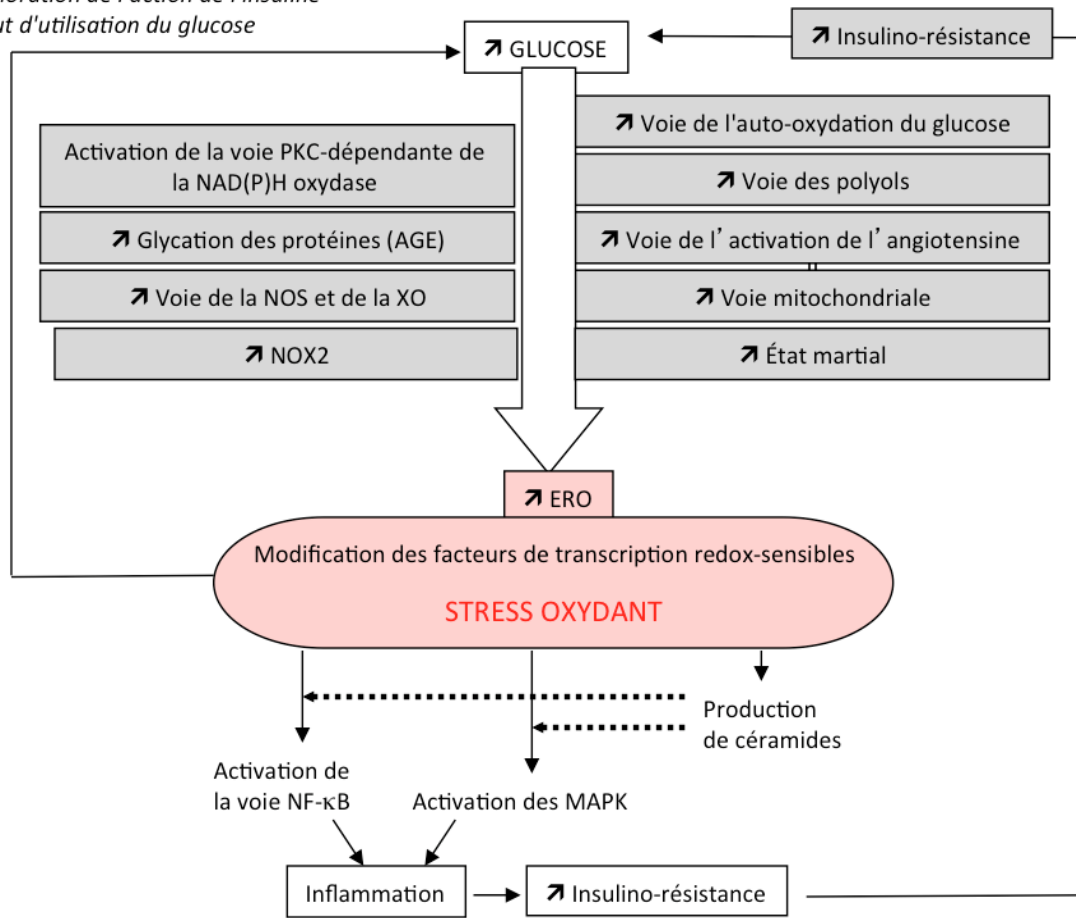


Figure 2 : Dommages induits par l'induction du diabète par STZ  
Tiré de « Schematic diagram of the STZ induced pancreatic damage in diabetes and its protection by CUR » D'après Rashid et al, 2015

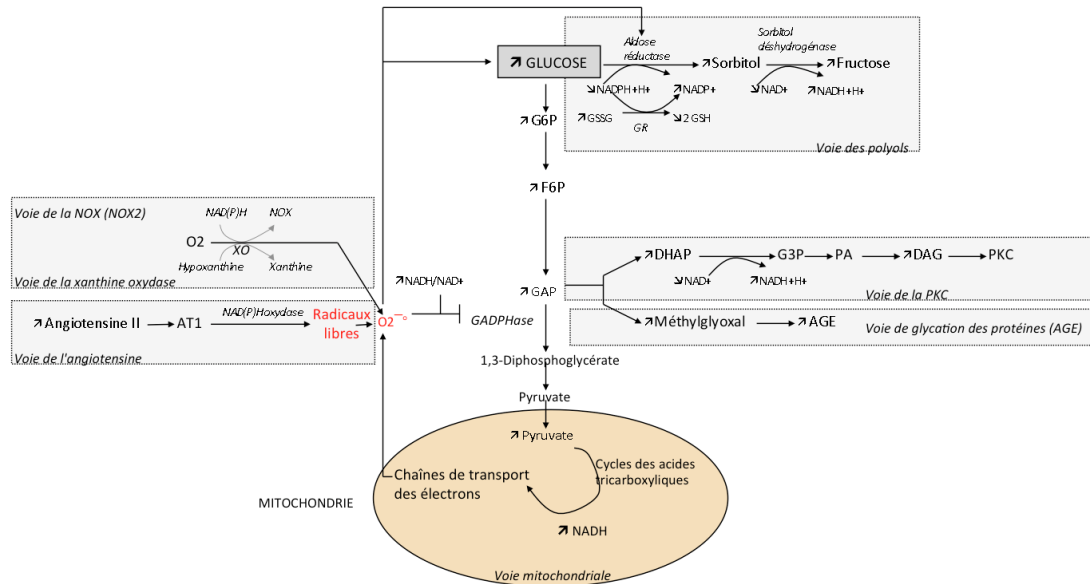


**Figure 5 : Stress oxydant : déséquilibre des espèces pro-oxydant et antioxydants (Modifié d'après Sies & Jones, 2007)**

Destruction des cellules pancréatiques  
 Détérioration de l'action de l'insuline  
 Défaut d'utilisation du glucose



**ZOOM :**



<b>Légende :</b>	H+ = Hydrogène	—  Inhibe
G6P = Glucose-6P	DHAP = Dihydroxyacétone phosphate	→ Active
F6P = Fructose-6P	G3P = Glycérol 3-P	X Enzyme
GAP = Glyceraldéhyde-3-phosphate	PA = Phosphatidate	
GR = Glutathion réductase	DAG = Diacylglycérol	
GSSG = Disulfure de glutathion	PKC = Protein kinase C	
GSH = Glutathion réduit	AGE = Produits de glycation avancés	
NAD(P)H = Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) hydrogen oxydase	O2 = Oxygène	
NAD(P) = Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)	NOX ou NADPH oxydase	
	AT1 = Angiotensine trophique vasoconstricteur 1	
	O2 <sup>-</sup> = Anion superoxyde	

**Figure 6 : Les différentes sources de la production des espèces radicalaires**



Composants	Valeur	Unité	Composants	Valeur	Unité	Composants	Valeur	Unité	Composants	Valeur	Unité	Composants	Valeur	Unité
Cystine	0,59	g/100g	Vitamine C	<2,5	mg/100g	Acide palmitique C16:0	27,1	%	Glucose	<0,1	g/100g	Acide palmitolique C16:1	4,2	%
Acide aspartique	5,86	g/100g	Vitamine E	6,84	mg/100g	Acide oléique C18:1	1,4	%	Fructose	<0,1	g/100g	Acide heptadécénoïque C17:1	0,1	%
Proline	2,29	g/100g	Vitamine K1	6,7	µg/100g	Phosphore	1353,8	mg/100g	Lactose	<0,1	g/100g	Acide stéarique C18:0	0,3	%
Méthionine	1,49	c	Sélénium	<0,05	mg/kg	Calcium	310,4	mg/100g	Saccharose	<0,1	g/100g	Acide oléique C18:1	1,4	%
Thréonine	3,1	g/100g	Sodium	1338,2	mg/100g	Cuivre	1,83	mg/100g	Maltose	<0,1	<0,1	Autres isomères Acide oléique	0,2	%
Sérine	3,1	g/100g	Phosphore	1353,8	mg/100g	Fer	76,43	mg/100g	Glucide totaux	16,5	g/100g	Acide linoléique C18:2	14,2	%
Acide glutamique	8,8	g/100g	Calcium	310,4	mg/100g	Magnésium	434,2	mg/100g	Fibres totales	7,4	g/100g	Autres isomères C18:2	0,1	%
Glycine	3,03	g/100g	Cuivre	1,83	mg/100g	Manganèse	7,06	mg/100g	Phycocyanine	15	g/100g	Acide alpha-linoléique C18:3	0,1	%
Alanine	4,73	g/100g	Fer	76,43	mg/100g	Potassium	1932	mg/100g				Autres isomères C18:3	16,7	%
Valine	4,02	g/100g	Magnésium	434,2	mg/100g	Zinc	7,43	mg/100g				Acide érucique C22:1	0,2	%
Isoleucine	3,47	g/100g	Manganèse	7,06	mg/100g	<b>Lipides totaux</b>	<b>6,3</b>	<b>g/100g</b>				<b>Stérols totaux</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>g/100g</b>
Leucine	5,56	g/100g	Potassium	1932	mg/100g	Acides gras saturés	60,79	%	Cholestérol	13,6	%	Cholestérol	<0,1	%
Tyrosine	2,84	g/100g	Zinc	7,43	mg/100g	Acides gras insaturés	39,21	%	Cholestanol	<0,1	%	Brassicastérol	26,3	%
Phénylalanine	2,81	g/100g	<b>Lipides totaux</b>	<b>6,3</b>	<b>g/100g</b>	Acides gras monoinsaturés	6,70	%	24-Méthyl cholestérol	2,2	%	Campesterol	30,9	%
Lysine	2,85	g/100g	Acides gras saturés	60,79	%	Acides gras polyinsaturés	31,18	%	Campesterol	<0,1	%	Campestanol	9,3	%
Histidine	0,93	g/100g	Acides gras insaturés	39,21	%	Acides gras Oméga 3	0,12	%	Stigmasterol	9,3	%	D7 campesterol	<0,1	%
Arginine	3,99	g/100g	Acides gras monoinsaturés	6,70	%	Acides gras Oméga 6	14,31	%	D7 campesterol	<0,1	%	D5,23-Stigmastadienol	0,5	%
Tryptophane	1,03	g/100g	Acides gras polyinsaturés	31,18	%	Oméga 6/Oméga 3	116,87	µg/100g	D5,23-Stigmastadienol	0,5	%	Clérostérol	0,8	%
Phénylalanine	5,65	g/100g	Oméga 6/Oméga 3	116,87	µg/100g	Lipides saturés	3,8	g/100g	Sitostérol	14,5	%	Sitostanol	0,8	%
<b>Total des acides aminés</b>	<b>59,43</b>	<b>g/100g</b>	Lipides saturés	3,8	g/100g	Lipides insaturés	2,5	g/100g	D5-Avenastérol	1,1	%	D5,24-Stigmastadienol	<0,1	%
Vitamine A	<20	µg/100g	Lipides insaturés	2,5	g/100g	Lipides monoinsaturés	0,4	g/100g	D7-Stigmastérol	<0,1	%	D7-Avenastérol	<0,1	%
β-Carotène	24,92	mg/100g	Lipides monoinsaturés	0,4	g/100g	Lipides polyinsaturés	2,0	g/100g	<b>Total sucres</b>	<b>0</b>	<b>g/100g</b>			
Vitamine B1	1,79	mg/100g	Acide caprylique C8:0	1,3	%	Acide caprylique C8:0	1,3	%						
Vitamine B12	61,3	µg/100g	Acide nonanoïque C9:0	1	%	Acide nonanoïque C9:0	1	%						
Vitamine B2	1,8	mg/100g	Acide caprique C10:0	31	%	Acide caprique C10:0	31	%						
Vitamine B3	8,5	mg/100g	Acide caproïque C10:1	0,2	%	Acide caproïque C10:1	0,2	%						
Vitamine B5	0,05	mg/100g	Acide isotridécanoïque C13:0 iso	0,1	%	Acide isotridécanoïque C13:0 iso	0,1	%						
Vitamine B6	0,09	mg/100g												
Vitamine B8	<0,5	µg/100g												
Vitamine B9	156	µg/100g												

**Tableau 2 :**

**Composition détaillée des paillettes de spiruline**

### Western Blot

**Étape 1) Homogénéats:** Afin d'homogénéiser les tissus prélevés, ils sont déposés dans un tampon de lyse, qui est préparé au préalable. Cette homogénéisation permet de stabiliser le pH de la solution et de maintenir les réactions enzymatiques intactes en diminuant la dégradation des protéines. Puis les échantillons sont centrifugés pour prélever les extraits cytosoliques (Surnageants), qui sont alors congelés à -80°C dans l'attente d'analyse. Cette centrifugation augmente la rupture des membranes nucléaires et mitochondriales, pour séparer les surnageants des déchets.

**Étape 2) Quantification des protéines:** Pour déterminer la quantité totale des protéines contenues dans les échantillons, la méthode de spectrophotométrie est utilisée pour déterminer la concentration des protéines *via* une gamme d'étalon. Les échantillons sont dilués, incubés dans une solution de Lowry, puis mis dans une solution de Folin dans l'obscurité. La coloration bleue *via* la solution de Folin met en exergue les acides aminés.

**Étape 3) Migration des protéines par électrophorèse:** Au préalable, les gels de concentration et de séparation sont préparés et déposés entre des plaques de verre. Le gel de concentration permet que toutes les protéines migrent ensemble à la même vitesse. Le gel de séparation permet de dissocier les protéines selon leur vitesse de migration différente. Les échantillons sont déposés dans les puits, avec un marqueur (Bleu de Bromophénol) pour suivre l'électrophorèse. Sous l'influence d'un champs électrique, les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire.

**Étape 4) Transfert des protéines sur membrane:** De nouveau, les protéines fixées sur les gels sont placées sous l'influence d'un champs électrique pour se fixer sur les membranes de nitrocellulose. Dans une chambre froide, les protéines sont transférées au sein d'un sandwich composé de couche d'éponges, de papiers filtre, de gel et de papier à membrane, situées dans une cuve rempli de tampon de transfert. Par la suite, les membranes sont incubées dans une solution de rouge Ponceau pour vérifier le bon déroulement du transfert et la migration des protéines sur la membrane. Puis sous agitation, les membranes sont lavées plusieurs fois dans une solution de TBS-T à 0,05% (Tris-Buffer Saline Tween).

**Étape 5) Blocage de la membrane:** Ce blocage permet de saturer les sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps. À température ambiante et sous agitation, les membranes sont incubées dans des tampons de blocage (BSA (Sérum Albumine Bovine) ou lait avec du TBS-T).

**Étape 6) Incubation avec un anticorps primaire:** Pour mettre en évidence les protéines recherchées, les anticorps primaires sont déposés sur les membranes et incubés à 4°C sous agitation toute la nuit. Ils vont reconnaître, se fixer sur les protéines spécifiques et former un complexe anticorps-antigène (Protéines reconnues comme antigènes). Puis la solution de lavage spécifique (TBS-T) permet de rincer les membranes (3 fois).

**Étape 7) Incubation avec un anticorps secondaire :** Au niveau du complexe formé au préalable, l'anticorps secondaire détecte les emplacements des fixations des anticorps primaires sur les antigènes. L'anticorps secondaire est choisi en fonction de sa capacité à reconnaître l'anticorps primaire : soit anti-rabbit ou anti-mouse (*Cf Tableau 2 ci dessous*). Puis les échantillons sont incubés dans des solutions de TBS-T, de blocage spécifique à chaque anticorps (BSA ou lait), d'anticorps dilué dans les conditions suivantes : à températures ambiantes, sous agitation et dans l'obscurité. Enfin, les membranes sont rincées dans la solution de TBS-T (3 fois).

**8) Révélation et quantification des protéines d'intérêt :** À l'aide de la méthode de chimioluminescence, la position des complexes anticorps-antigènes (à savoir l'activité enzymatique de HRP liée à l'anticorps secondaire) est trouvée. Les signaux sont quantifiés à travers le logiciel « ImageGauge ».

*Figure 12 : Étapes du Western Blot réalisé dans cette étude*

<i>Protéine d'intérêt</i>	<i>Poids moléculaire</i>	<i>Référence</i>	<i>Saturation</i>	<i>Incubation</i>	<i>Dilution</i>
4-HNE	156 kDA	Abcam (Rabbit/Mouse)	Lait 10%	BSA	1 : 1000
FoXO3a	97 kDA	Cell Signaling (Rabbit)	Lait 10%	Lait	1 : 1000
HSC 70	70 kDA	Abcam (Rabbit)	Lait 5%	Lait	1 : 1000
NF-κB p65	60-65 kDA	Abcam (Rabbit)	Lait 5%	Lait	1 : 1000
Akt	60 kDA	Cell Signaling (Rabbit)	Lait 5%	BSA	1 : 1000
p-Akt Ser473	60 kDA	Cell Signaling (Rabbit)	Lait 5%	BSA	1 : 1000

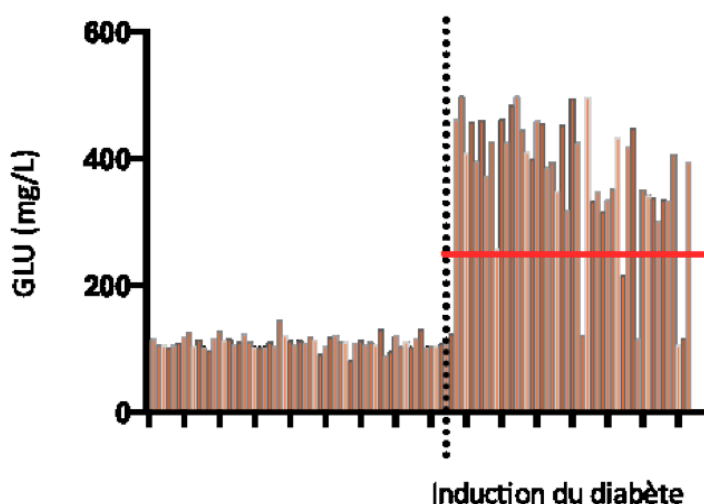
*Tableau 2 : Récapitulatif des protéines d'intérêt, de leur forme phosphorylée/totale*

<i>Étapes</i>	<i>Descriptifs</i>
<b>1</b>	Déparaffinage 8 minutes à 75°C avec l'EZ Prep Roche•c
<b>2</b>	Étape de pré-traitement permettant de rompre les liaisons moléculaires créées par le fixateur et modifiant la configuration spatiale des épitopes et leur accessibilité aux antigènes : Démasquage antigénique des coupes 8 minutes à 95°C puis 28 minutes à 100°C avec le tampon CC1 •R (Tris, pH=8)
<b>3</b>	Étape d'inhibition des peroxydases endogènes afin d'éviter le bruit de fond dû à la coloration de la peroxydase des hématies : blocage de l'activité peroxydasique du tissu étudié : Traitement H2O2
<b>4</b>	Incubation des anticorps primaires durant 60 minutes à 37°C : <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Anticorps iNOS : ab15323</li> <li>▪ Anticorps CD68 : AB125212</li> <li>▪ Anticorps CD163 : ab182422</li> <li>▪ Anticorps MPO : A0398</li> </ul>
<b>5</b>	Lavage dans du tampon Tris (pH 7,4)
<b>6</b>	Incubation de l'anticorps secondaire anti-Rabbit couplé à l'HRP pendant 16

	minutes à 37°C (peroxydase de raifort : réactif de détection)
<b>7</b>	Révélation sur une durée de 8 minutes avec la diaminobenzidine (OmniMapDAB•R Roche)
<b>8</b>	Contre coloration à l'hématoxyline de Mayer
<b>9</b>	Déshydratation
<b>10</b>	Montage entre lames et lamelles
<b>11</b>	Numérisation des lames <i>via</i> le scanner Hamamatsu Nanozoomer 2.0 RS.
<b>12</b>	Traitement des données : Une fois l'immunomarquage effectué et numérisé, le zoom des coupes est standardisé grâce au logiciel NDP.View•c . La coupe est grossie 1,25 fois sur le logiciel et 10 fois à l'export de l'image. L'analyse s'effectue ensuite par traitement d'image via le logiciel Image pro plus 6c. Le principe de ce logiciel est de repérer la couleur d'un pixel donné et de quantifier son apparition sur la coupe. Ainsi les pixels bruns permettent de quantifier l'infiltration en lien avec les dommages musculaires et les phénomènes inflammatoires associés, via le nombre de noyaux marqués et l'intensité du phénomène (densité de pixels). Afin d'avoir la densité, l'aire totale chaque de coupe était aussi quantifiée. Chaque donnée était transférée sur un tableau excel à partir duquel on pouvait exprimer pour chaque coupe la somme des aires des marqueurs d'intérêt sur l'aire totale de la coupe puis exprimer les marqueurs en pourcentage d'aire de la coupe totale.

*Tableau 3 : Détails et descriptifs des étapes de la technique d'immunohistochimie analysant les marqueurs iNOS, MPO, CD68 et CD163*

### Chapitre 3 : Résultats



*Figure 13 : Glycémie avant et après l'induction du diabète par STZ chez les rats*

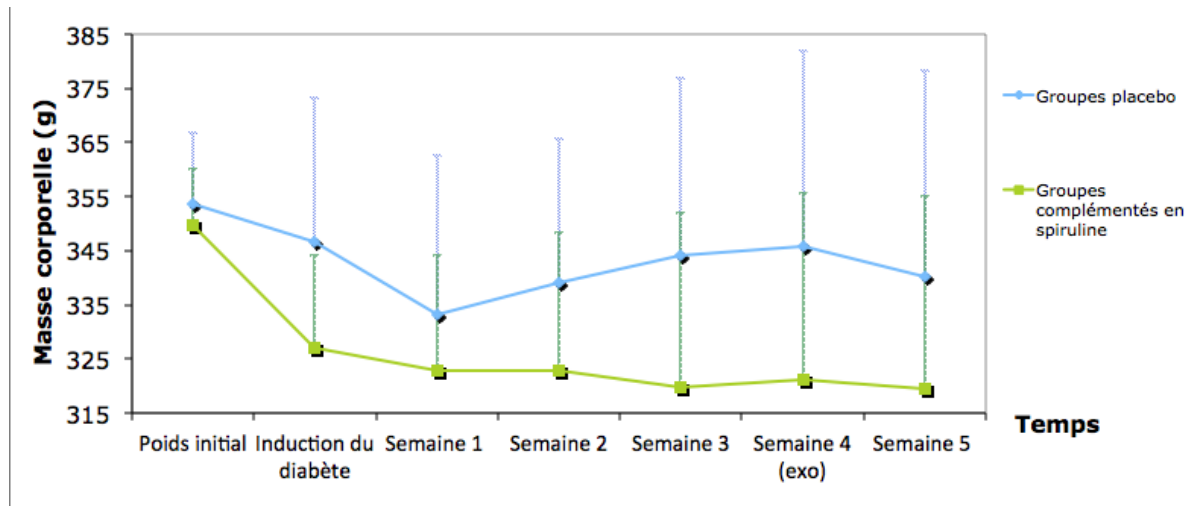


Figure 14 : Évolution de la masse corporelle chez les rats diabétiques complémentés en spiruline et placebo

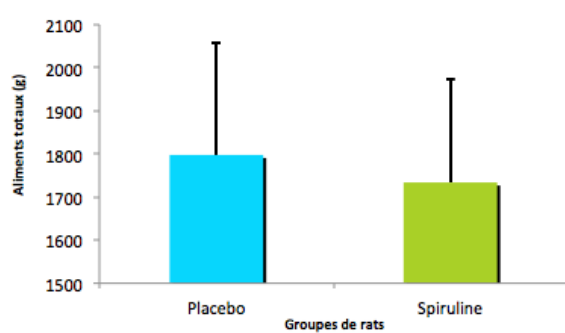


Figure 15 : Prise alimentaire totale des rats diabétiques complémentés en spiruline et placebo

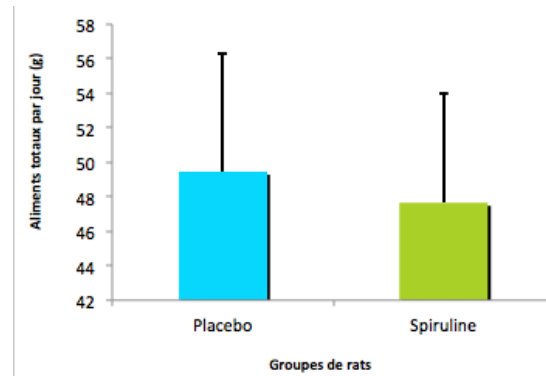


Figure 16 : Prise alimentaire par jour des rats diabétiques complémentés en spiruline et placebo

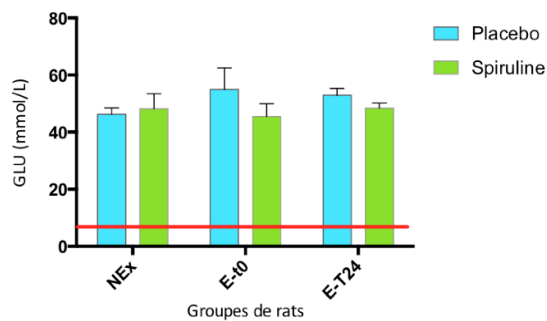


Figure 18 : Concentration plasmatique de glucose des rats diabétiques complémentés en spiruline et placebo, avec ou sans exercice aigu

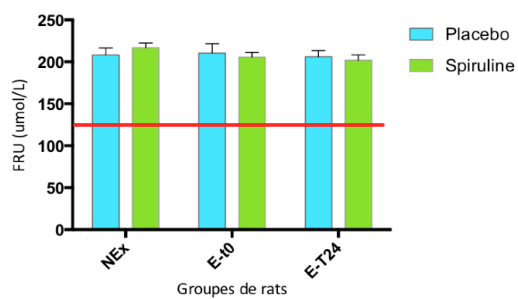


Figure 19 : Concentration plasmatique de fructosamine des rats diabétiques complémentés en spiruline et placebo, avec ou sans exercice aigu

## Résumé

**Introduction** : Le diabète est caractérisé par une hyperglycémie chronique, une insulino-résistance et/ou d'une insulino-sécrétion *via* les cellules  $\beta$ -pancréatiques, une glucotoxicité et une apoptose des cellules sécrétrices de l'insuline. L'état inflammatoire et le stress oxydant sont des facteurs, qui sont probablement à l'origine et ne font qu'amplifier ces phénomènes chez les diabétiques. En perturbant les voies de signalisation de l'insuline, ces facteurs bloquent la protéosynthèse et stimulent la protéolyse myofibrillaire. Or, après un exercice physique, la régénération musculaire est un élément indispensable à la récupération musculaire. Les risques de dommages musculaires sont alors augmentés.

**But** : L'objectif de ce travail est d'étudier les effets de la spiruline sur les dommages musculaires induits par le diabète et par un exercice dommageable chez des rats.

**Protocole** : Des rats mâles Wistar âgés de neuf semaines ont été rendus diabétique par une injection intrapéritonéale de 45 mg/kg de STZ. Par la suite, ils ont été complémentés ou non complémentés en spiruline pendant quatre semaines. Puis ils sont soumis à un exercice aigue de type excentrique induisant des dommages musculaires ou non et sacrifiés immédiatement après l'exercice ou un jour après.

**Résultats** : Quatre semaines de complémentation en spiruline ne semblent pas induire de modifications au niveau du contrôle glycémique et de la balance protéique. Les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires limitant l'activation de la protéolyse se font surtout ressentir après un exercice dommageable. La complémentation semble augmenter davantage la masse musculaire chez les rats sédentaires, mais ne permet pas de limiter les dommages musculaires de manière importante, comme chez les rats après un exercice dommageable.

**Conclusion** : Sur la base de ces résultats, la limitation des dommages musculaires induits par le diabète par la spiruline n'est pas concluante. Néanmoins, pour la limitation des dommages musculaires induits par un exercice aigue, la spiruline semble être prometteuse. L'étude en parallèle de huit semaines de complémentation en spiruline pourrait venir appuyer, approfondir ses résultats et donc étayer les données de littérature manquantes sur la spiruline et la récupération musculaire.

**Mots clés** : spiruline, diabète, dommages musculaires, récupération musculaire, exercice aigue

## **Abstract**

**Introduction** : Diabete is characterized by a chronic hyperglycemia, an insulino-resistance and/or insulino-secretion by  $\beta$ -pancreatic, a glucose intolerance and a apoptose of the secretary cells of the insulin. The inflammatory state and the oxidative stress are factors, which are probably originally and are amplifying these phenomena at diabetics. By perturbing the ways or road of the insulin, these factors stop the protein synthesis and stimulate the protein degradation. Now, after a physical exercise, the muscular regeneration is an element essential to the muscular recovery. The risks of muscular damage are then increased.

**Purpose** : The aim of this work is to study the effects of the spirulina on the muscular damage induced by the diabetes and a harmful exercise in rat.

**Material and methods** : Male old rats Wistar of nine weeks were submitted to an injection of 45 mg/kg of STZ. Afterward, they were complemented spirulina or not during four weeks. Then they made an acute exercise of eccentric type induced muscular damage or not and they are sacrificed immediately after exercise or one day later.

**Results** : Four weeks of complementation of spirulina don't seem to induce modification at the level of the glycemic control and of the protein balance. The antioxidizing and anti-inflammatory properties are felt especially after a exercise. The complementation seems to increase more mass muscle among the sedentary rats, but she doesn't allow limiting the muscular damage, as among rats after a exercise.

**Conclusion** : The limitation of the muscular damage induced by the diabete by spirulina isn't decisive. Nevertheless, those on the limitation of the muscular damage induced by acute exercise by the spirulina seem to be promising. In parallel, the study of eight weeks of complementation by spirulina could come to deepen its results and so support the missing data of literature on the spirulina and the muscular recovery.

**Key words** : *spirulina, diabete, muscular damage, muscular recovery, acute exercise*