

Université de Montréal

**Contribution à l'étude du métabolisme du glucose et de la néoglucogénèse à
l'exercice et l'entraînement**

par

Yan BURELLE

Département de kinésiologie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
En Sciences de l'activité physique

Mars 2000
Yan Burelle, 2000





National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-53290-9

Canada

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**Contribution à l'étude du métabolisme du glucose et de la néoglucogénèse à
l'exercice et l'entraînement**

Présentée par:

Yan BURELLE

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Président-rapporteur: Phillip Gardiner
Directeur: François Péronnet
Co-directeur: Denis Massicotte
Membre du jury: Jean-Marc Lavoie
Examineur externe: Angelo Tremblay
Représentant de la F.E.S.: Marielle Ledoux

Thèse acceptée le:

13 juin 2000

SOMMAIRE

Les quatre études présentées dans cette thèse de Doctorat s'inscrivent dans deux des principaux axes de recherche du laboratoire dirigé par François Péronnet et Denis Massicotte. Le premier axe, dans lequel deux études s'inscrivent, est celui de l'identification des conditions (type de glucides ingérés, quantité, période d'ingestion etc...) qui maximisent l'utilisation des glucides exogènes à l'exercice. Dans ce contexte, ces deux études ont eu comme principal but de mesurer l'oxydation de différents précurseurs néoglucogéniques (lactate, glycérol et alanine) ingérés immédiatement avant ou pendant l'exercice prolongé en combinaison avec du glucose. Aucune donnée n'était disponible à ce sujet et quelques études suggéraient que ces substrats pourraient contribuer à la production d'énergie et favoriser l'entretien du pool des intermédiaires du cycle de Krebs qui diminue progressivement au cours de l'exercice prolongé. Le second but de ces études était d'identifier par quelle voie ces précurseurs sont oxydés. En effet, que ce soit pour le lactate, le glycérol ou l'alanine, deux grandes voies peuvent mener à leur oxydation en CO₂. La première est la conversion de ces substrats en glucose, suivie de l'oxydation de ce glucose par les tissus périphériques. La seconde voie est la prise et l'oxydation directe de ces substrats par les tissus périphériques.

Dans la première étude l'oxydation respective de ¹³C-lactate et de ¹³C-glucose ingérés simultanément (25 et 75 g respectivement) au cours d'un exercice de 90 minutes effectué à 65 ± 3 % du VO₂max a été mesurée chez six sujets mâles. Les résultats ont montré que, lorsque exprimée en pourcentage de la quantité ingérée, l'oxydation du lactate et du glucose présents dans le mélange étaient similaires (48 ± 3 vs 45 ± 5 % respectivement). Par contre, la quantité de lactate qui a été possible d'administrer sans occasionner de malaises gastro-intestinaux, était beaucoup plus faible que pour le glucose. En conséquence, l'oxydation absolue du lactate était trois fois moindre que celle du glucose ($11,1 \pm 0,5$ vs $36,3 \pm 1,3$ g / 120 min respectivement) et sa contribution à la fourniture d'énergie était seulement de $2,6 \pm 0,4$ % comparativement à $8,4 \pm 1,9$ % pour le glucose exogène. Lorsque l'oxydation totale du mélange de glucose et de lactate a été calculée, celle-ci s'est avérée similaire à l'oxydation d'une quantité isocalorique de ¹³C-glucose (100 g) ingérée dans des conditions similaires ($47,3 \pm 1,8$ vs $50,9 \pm 1,2$ g /

120 min respectivement). Lorsque du ^{13}C -glucose était ingéré, la mesure du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du glucose plasmatique a révélé qu'entre 31 et 61 % du glucose circulant était d'origine exogène. Au contraire, lorsque du ^{13}C -lactate était ingéré, aucune modification du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ n'a été observée dans le glucose plasmatique. Il a donc été conclu que la majeure partie du lactate exogène ingéré au cours de l'exercice est directement oxydé dans les tissus périphériques, sans conversion préalable en glucose par le foie. De plus, bien que le lactate soit relativement bien oxydé, il a été conclu que les faibles doses qu'il est possible d'administrer sans occasionner de malaises gastro-intestinaux en font un substrat exogène moins avantageux que le glucose.

Dans la deuxième étude, le marquage sélectif au ^{13}C a été utilisé pour mesurer l'oxydation respective du lactate, du glycérol, ou de l'alanine (C_3 -substrats: 25 g), ingérés en combinaison avec une quantité équivalente de glucose (25 g), immédiatement avant un exercice de 120 minutes effectué à $68 \pm 2\%$ du VO_2max chez six sujets mâles. Les résultats ont montré que pendant les 80 dernières minutes d'exercice, la quantité de glucose exogène oxydée était similaire, peu importe avec quel type de C_3 -substrat le glucose était ingéré ($12,8 \pm 0,5$ g en moyenne). La quantité d'alanine oxydée ($13,5 \pm 0,6$ g) au cours de la même période était similaire à celle du glucose, et représentait 59 % de la dose d'alanine ingérée. Quant aux quantités de lactate et de glycérol oxydées, similaires l'une et l'autre ($8,5 \pm 0,7$ et $9,9 \pm 0,9$ g respectivement), elles étaient 37 et 27 % inférieures respectivement à celle de l'alanine, représentant néanmoins plus 37 % de la dose ingérée. Lorsque du ^{13}C -lactate ou de la ^{13}C -alanine était ingéré en combinaison avec du glucose non marqué, le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du glucose plasmatique a augmenté de 4‰ $\delta^{13}\text{C PDB}_1$ en moyenne, soit de -20‰ $\delta^{13}\text{C PDB}_1$ au repos avant l'ingestion de substrats marqués, à -16‰ $\delta^{13}\text{C PDB}_1$ après 60 à 80 minutes d'exercice. Il a donc été conclu qu'une fraction du lactate et de l'alanine exogène était transformée en glucose au niveau du foie et libérée en circulation pour l'oxydation dans les tissus périphériques. Cependant, la comparaison des rapports $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du glucose circulant et du CO_2 expiré observés dans ces conditions expérimentales suggère que l'oxydation directe du lactate et de l'alanine dans les tissus périphériques, sans conversion préalable en glucose par le foie est probablement la principale voie d'oxydation de ces deux C_3 -substrats. En effet,

le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ observé dans le CO_2 expiré était systématiquement plus élevé que celui du glucose circulant au cours des 120 minutes d'exercice (CO_2 : $-15,2 \pm 0,4$ et $-12,0 \pm 0,4$; glucose plasmatique: $-17,8 \pm 0,2$ et $-16,9 \pm 0,4$ ‰ $\delta^{13}\text{C}$ PDB.₁ dans les conditions ^{13}C -lactate et ^{13}C -alanine respectivement). Globalement, il a également été conclu que le glycérol et l'alanine, qui sont bien tolérés par l'intestin, pourraient constituer un complément intéressant au glucose exogène, puisque ces substrats sont bien oxydés et ne semblent pas interférer avec l'absorption et/ou l'oxydation du glucose.

Le second axe de recherche sous lequel s'inscrivent les deux dernières études présentées dans la thèse concerne les effets de l'entraînement sur le métabolisme du glucose. Dans la troisième étude de la thèse, l'oxydation de 100 g de ^{13}C -glucose ingéré au repos ou durant l'exercice a été mesurée chez six sujets sédentaires (SS) et six sujets entraînés (SE). L'oxydation du glucose circulant provenant du foie ainsi que du glycogène musculaire ont également été mesurés à partir du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du glucose circulant, du V^{13}CO_2 mesuré à la bouche, et de la calorimétrie indirecte respiratoire corrigée pour l'oxydation des protéines. L'hypothèse était que l'oxydation du glucose exogène pourrait être favorisée chez les sujets entraînés compte tenu de leur meilleure tolérance au glucose et de leur sensibilité accrue à l'insuline, bien que l'entraînement soit généralement associé à une diminution de la dépendance envers les glucides comme substrats énergétiques. Les résultats ont montré qu'au repos, le devenir oxydatif du glucose exogène ($8,3 \pm 0,3$ vs $6,6 \pm 0,8$ g/h), ainsi que du glucose provenant du foie ($4,4 \pm 0,5$ vs $2,6 \pm 0,4$ g/h) étaient plus élevés chez les sujets entraînés que chez les sujets sédentaires. Ceci était accompagné d'une meilleure tolérance au glucose chez les sujets entraînés, qui affichaient une aire sous la courbe de la glycémie (95 ± 65 vs 335 ± 60 unités arbitraires) et de l'insulinémie (24 ± 5 vs 53 ± 10 unités arbitraires) inférieure à celle des sujets sédentaires. Au cours de l'exercice effectué à puissance absolue identique (140 ± 5 W: SE = $47 \pm 2,5$; SS = 68 ± 3 % du VO_2 max), l'oxydation du ^{13}C -glucose était plus élevée chez les sujets entraînés que chez les sujets sédentaires ($39,0 \pm 2,6$ vs $33,6 \pm 1,2$ g/h). Au contraire, l'oxydation du glucose provenant du foie ($16,8 \pm 2,4$ vs $24,0 \pm 1,8$ g/h) ainsi que celle du glycogène musculaire ($36,0 \pm 3,0$ vs $51,0 \pm 5,4$ g/h) était inférieure chez les sujets entraînés. Au cours de l'exercice effectué à puissance

relative comparable ($68 \pm 3\%$ VO_2max : $\text{SE} = 3,13 \pm 0,96$; $\text{SS} = 2,34 \pm 0,60 \text{ L O}_2/\text{min}$), l'oxydation du glucose exogène ($44,4 \pm 1,8$ vs $33,6 \pm 1,2 \text{ g/h}$) et du glycogène musculaire ($73,8 \pm 7,2$ vs $51,0 \pm 5,4 \text{ g/h}$) était plus élevée chez les sujets entraînés que chez les sujets sédentaires. Cependant, malgré une dépense énergétique plus élevée chez les sujets entraînés, l'oxydation du glucose provenant du foie était similaire dans les deux groupes ($22,2 \pm 3,0$ vs $24,0 \pm 1,8 \text{ g/h}$). Dans l'ensemble, cette étude a donc mis en évidence que lorsqu'une quantité significative de glucose exogène était disponible, les sujets entraînés l'oxydaient de façon préférentielle ce qui, à l'exercice, résultait en une économie du glycogène hépatique et musculaire. Les résultats obtenus au repos ont également suggéré que ceci serait en partie dû à la modification de la tolérance au glucose et probablement de la sensibilité à l'insuline.

La quatrième étude de la thèse est le fruit d'une collaboration avec le Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée de Grenoble. Ce laboratoire, dirigé par Xavier Leverve possède une grande expertise dans l'étude du métabolisme hépatocytaire. Cette collaboration a permis d'étudier, à l'aide d'un modèle d'hépatocytes isolés incubés ou périfusés, les effets de l'entraînement en endurance sur la capacité néoglucogénique à partir de différents précurseurs (alanine, lactate - pyruvate, glycérol, dihydroxyacétone) chez le Rat. Les résultats des expériences d'incubations en présence de concentrations saturantes de substrats (20 mM) ont montré que l'entraînement augmentait le flux néoglucogénique (J_{glucose}) à partir de l'alanine (+ 64 %), du glycérol (+ 21 %), du lactate-pyruvate (+ 18%) et du dihydroxyacétone (+ 10 %). L'étude plus poussée des mécanismes par lesquels l'entraînement stimulait la néoglucogénèse à partir de l'alanine a par la suite été effectuée. La capacité maximale du transport membranaire de l'alanine, mesurée lors d'incubation en présence d'un inhibiteur des transaminases hépatique, était 50 % plus élevée dans les hépatocytes de rats entraînés que dans les hépatocytes de rats sédentaires. Les expériences de périfusion d'hépatocytes ont montré que pour des concentrations d'alanine inférieures à environ 1 mM, l'augmentation de la capacité de transport membranaire de l'alanine était probablement responsable de l'augmentation de J_{glucose} induit par l'entraînement. Cependant, pour des concentrations d'alanine supérieures à environ 1 mM, l'augmentation de J_{glucose} était due à une

augmentation du flux de transamination de l'alanine en pyruvate. Des évidences indirectes ont suggéré que ceci était dû à une augmentation de l'apport en α -cétoglutarate à l'alanine transaminase, résultant d'une augmentation de l'activité de la navette malate-aspartate. En effet, au cours des expériences de périfusion, la consommation d'oxygène et la force proton motrice mitochondriale (appréciée à l'aide du rapport $\text{NADH/NAD}_{\text{mitochondrial}} / \text{NADH/NAD}_{\text{cytosolique}}$), deux déterminants de l'activité de cette navette, étaient respectivement 8 et 105 % plus élevés dans les hépatocytes de rats entraînés.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire.....	iii
Table des matières.....	viii
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures.....	xiii
Listes des sigles et abréviations.....	xvii
Remerciements.....	xix
CHAPITRE 1: REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
.1. Introduction.....	2
.1.1. Présentation des études expérimentales.....	2
.1.1.1. Oxydation de substrats exogènes à l'exercice.....	2
.1.1.2. Mesure de l'oxydation du glycogène hépatique et musculaire à l'exercice.....	4
.1.1.3. Effets de l'entraînement sur le métabolisme du glucose.....	13
.1.2. Présentation de la revue de la littérature.....	15
.2. Méthodes d'investigation de la néoglucogénèse in vivo.....	17
.2.1. Techniques classiques.....	17
.2.1.1. Différence artério-veineuse hépatique.....	17
.2.1.2. Biopsie hépatique.....	20
.2.1.3. Infusion de précurseurs néoglucogéniques marqués au ¹⁴ C ou au ¹³ C.....	22
.2.1.4. Infusion de ¹³ C ou ¹⁴ C-bicarbonates.....	23
.2.2. Quantification de l'échange isotopique et modélisation de la néoglucogénèse et du cycle de l'acide citrique.....	27
.2.2.1. Modèle de Weinman et al.....	27
.2.2.2. Facteur de correction de Hetenyi (H).....	33
.2.2.3. Méthode de Katz avec le [2- ¹⁴ C ₁]-acétate ou le [3- ¹⁴ C ₁]-pyruvate....	33
.2.2.4. Limitations à l'usage de [2- ¹⁴ C ₁]-acétate in vivo et Insuffisances du modèle de Weinman et al.....	35
.2.2.5. Biopsie chimique au phényl-acétate.....	36
.2.2.6. Infusion de [U- ¹³ C ₆]-glucose.....	39

.2.3.	Méthodes isotopiques ne nécessitant pas de modèle de correction pour les échanges et la dilution isotopique dans le cycle de Krebs.....	44
.2.3.1.	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du ¹³ C-glycogène (¹³ C-RMN) couplée à l'imagerie de résonance magnétique (IRM)..	44
.2.3.2.	Méthode de l' ² H ₂ O.....	48
.2.3.3.	Analyse de distribution d'isotopomères de masse.....	54
.2.3.4.	Enrichissement préalable du glycogène au ¹³ C.....	60
.3.	Contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose.....	67
.3.1.	Contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose au repos.....	67
.3.1.1.	Contribution relative et absolue de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose.....	67
.3.1.2.	Contribution des différents précurseurs.....	75
.3.2.	Contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose à l'exercice.....	77
.3.2.1.	Métabolisme hépatique du glucose à l'exercice chez l'Homme.....	79
.3.2.1.1.	Production hépatique de glucose.....	79
.3.2.1.2.	Contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse...	81
.3.2.2.	Métabolisme hépatique du glucose à l'exercice chez le Chien.....	91
.3.2.2.1.	Production hépatique de glucose.....	91
.3.2.2.2.	Contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse...	93
.3.2.3.	Métabolisme hépatique du glucose à l'exercice chez le Rat.....	95
.3.2.3.1.	Production hépatique de glucose.....	95
.3.2.3.2.	Contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse...	98
.4.	Effet de l'entraînement en endurance sur le métabolisme du glucose circulant à l'exercice.....	107
.4.1.	Effets de l'entraînement en endurance sur la production hépatique de glucose chez l'Homme.....	107
.4.1.1.	Taux de renouvellement du glucose circulant.....	107

.4.1.2. Contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose.....	110
.4.1.3. Effet de l'entraînement en endurance sur les mécanismes de régulation de la production hépatique de glucose.....	117
.4.2. Effets de l'entraînement sur la production hépatique de glucose chez le Rat.....	121
.4.2.1. Taux de renouvellement du glucose circulant.....	121
.4.2.2. Contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose.....	122
.4.2.3. Mécanismes impliqués l'accroissement de la capacité néoglucogénique.....	124
.5. Bibliographie.....	134
CHAPITRE 2: ÉTUDES EXPÉRIMENTALES.....	158
.1. Respective oxidation of lactate and glucose ingested simultaneously during exercise using ¹³ C-labeling.....	159
.2. Oxidation of selected ¹³ C labeled gluconeogenic precursors ingested along with glucose during prolonged exercise.....	167
.3. Oxidation of an oral [¹³ C]-glucose load at rest and prolonged exercise in trained and sedentary subjects.....	198
.4. Mechanisms of increased gluconeogenesis from alanine in rat isolated hepatocytes after endurance training.....	208
CHAPITRE 3: DISCUSSION ET CONCLUSION.....	217
.1. Études par traçage isotopique au ¹³C: Considérations méthodologiques.....	218
.1.1. Enrichissement en ¹³ C du CO ₂ expiré à la bouche.....	218
.1.2. Enrichissement en ¹³ C du glucose circulant et calcul de l'oxydation du glucose hépatique.....	223
.1.3. Conclusion.....	227
.2. Mécanismes impliqués dans l'augmentation de la capacité néoglucogénique induite par l'entraînement.....	228
.2.1. Augmentation de flux sans augmentation de l'activité enzymatique....	230

.2.2.	Notion d'étape limitante versus concepts d'analyse de contrôle métabolique.....	233
.2.3.	Conclusion.....	235
.3.	Bibliographie.....	236

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Oxydation du glucose et des acides gras mesurée au repos et à l'exercice à l'aide de la calorimétrie indirecte respiratoire et de l'enrichissement en ^{13}C du CO_2 expiré et des substrats énergétiques.....	6
Tableau 2: Sommaire des études qui ont mesuré la contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose chez l'Homme au repos, à l'aide de la ^{13}C -RMN, l' $^2\text{H}_2\text{O}$, l'ADIM et la biopsie hépatique.....	68
Tableau 3: Sommaire des études qui ont mesuré la contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose chez l'Homme à jeun, à l'aide de la différence artérioveineuse hépatique.....	70
Tableau 4: Production hépatique de glucose et contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse au cours de l'exercice de moins de 60 minutes chez l'Homme.....	84
Tableau 5: Production hépatique de glucose et contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse au cours de l'exercice prolongé chez l'Homme.....	87
Tableau 6: Production hépatique de glucose et contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse au cours de l'exercice prolongé chez le Chien.....	92
Tableau 7: Contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose chez le Chien au repos et à l'exercice: Comparaison de la différence porto-veineuse hépatique et de l'infusion de précurseurs marqués.....	96
Tableau 8: Production hépatique de glucose et contribution moyenne de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse à l'exercice chez le Rat soumis à différentes conditions nutritionnelles.....	101

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Enrichissement en ^{13}C du CO_2 issu de l'oxydation du glucose endogène au repos et à l'exercice lorsqu'une diète contenant des glucides enrichis en ^{13}C est imposée.....	7
Figure 2: Enrichissement en ^{13}C du glucose circulant au repos en situation postprandiale lorsqu'une diète contenant des glucides enrichis en ^{13}C est imposée.....	8
Figure 3: Contribution relative de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose chez des sujets sains et obèses à l'état postprandial.....	8
Figure 4: Enrichissement en ^{13}C des réserves de glycogène hépatique chez le Rat soumis à un exercice de déplétion suivi d'une diète glucidique riche en ^{13}C	12
Figure 5: Distribution des carbones du $[\text{U}-^{14}\text{C}_3]$ -pyruvate dans les intermédiaires de la voie néoglucogénique et du cycle de l'acide citrique.....	24
Figure 6: Incorporation d'isotopes dans le glucose lors d'une infusion de bicarbonates marqués.....	26
Figure 7: Facteurs influençant l'enrichissement isotopique du PEP lorsque des bicarbonates marqués sont utilisés.....	28
Figure 8: Modèle de la néoglucogénèse et du CAC proposé par Weinman et al. (1957).	30
Figure 9: Distribution du ^{14}C dans les intermédiaires du CAC, dans le PEP et dans le glucose, lorsque du $[2\ ^{14}\text{C}_1]$ -acétate est utilisé et que le CAC fonctionne en « circuit fermé ».....	32
Figure 10: Modèle du CAC et de la néoglucogénèse proposé par Magnusson et al. (1992).....	38
Figure 11: Modèle du CAC et de la néoglucogénèse proposé par Magnusson et al. (1992), tel que modifié par DesRosiers et al. (1995).....	40
Figure 12: Distribution d'isotopomères de masses du glucose lors d'une infusion continue de $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ -glucose.....	42

Figure 13: Incorporation de deutérium sur les carbones du glucose à partir de l' $^2\text{H}_2\text{O}$	50
Figure 14: Distribution d'isotopomères de masse du glucose lorsque du [U $^{13}\text{C}_3$]-glycérol est infusé.....	56
Figure 15: Combinaison de deux pools de glucose de taille égale formés à partir de deux pools de trioses-phosphates marqués au [U $^{13}\text{C}_3$]-glycérol ayant un enrichissement isotopique différent.....	59
Figure 16: Source de $^{13}\text{CO}_2$ lorsque le glycogène est sélectivement enrichi à l'aide d'une diète contenant des glucides marqués en ^{13}C	63
Figure 17: Contribution relative de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose au repos chez des sujets en période postprandiale immédiate et en réponse au jeûne de durée croissante.....	72
Figure 18: Production hépatique de glucose et contribution de la néoglucogénèse chez le Rat à jeun.....	76
Figure 19: Production hépatique de glucose chez l'Homme au cours d'un exercice de moins de 120 minutes.....	80
Figure 20: Production hépatique de glucose chez l'Homme au cours d'un exercice de plus de 120 minutes.....	80
Figure 21: Production hépatique de glucose au repos et à l'exercice en fonction de puissance relative (% VO_2max).....	82
Figure 22: Variation de la concentration de glycogène hépatique chez l'Homme en réponse à un exercice d'une heure à 75 % du VO_2max	82
Figure 23: Production hépatique de glucose et contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse chez l'Homme au cours d'un exercice de moins de 120 minutes.....	89
Figure 24: Production hépatique de glucose et contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse chez l'Homme au cours d'un exercice de plus de 120 minutes.....	90
Figure 25: Production hépatique totale de glucose et contribution de la néoglucogénèse chez le Chien à l'exercice.....	94

Figure 26: Taux d'apparition du glucose circulant au cours de l'exercice chez le Rat nourri et à jeun.....	97
Figure 27: Relation entre la puissance d'exercice et le taux d'apparition du glucose circulant chez le Rat.....	99
Figure 28: Contribution relative de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose chez le Rat à l'exercice et selon différents états nutritionnels.....	103
Figure 29: Effet de l'inhibition de la PEPCK avec du 3-mercaptopicolinate sur la variation de la concentration de glycogène hépatique et de la glycémie au cours de l'exercice prolongé chez le Rat.....	105
Figure 30: Effets de l'inhibition de la PEPCK avec du 3-mercaptopicolinate sur le taux de renouvellement du glucose circulant et sur la glycémie chez le Rat à l'exercice.....	106
Figure 31: Effet d'un programme d'entraînement en endurance de durée variable sur le taux d'apparition du glucose circulant observé au cours d'un exercice prolongé effectué à puissances absolues comparables.....	109
Figure 32: Effet de l'entraînement sur le taux de renouvellement du glucose circulant au cours d'un exercice effectué à puissances absolues et relatives comparables.....	111
Figure 33: Effet d'un programme d'entraînement en endurance sur la contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose au cours d'un exercice prolongé d'intensité modérée.....	113
Figure 34: Réponse de la production hépatique de glucose et de la glycémie lors d'un test d'hyperglucagonémie provoquée au repos chez des sujets sédentaires et entraînés.....	120
Figure 35: Effet de l'entraînement en endurance sur le métabolisme du glucose circulant au repos et à l'exercice chez le Rat.....	123
Figure 36: Effet de l'entraînement en endurance sur la capacité néoglucogénique chez le Rat.....	127

Figure 37: Voie de la néoglucogénèse.....	128
Figure 38: Effet de l'entraînement sur la néoglucogénèse à partir du lactate lorsque stimulée par la noradrénaline chez des rats provenant de différents groupes d'âges.....	130
Figure 39: Effet de l'entraînement sur la néoglucogénèse à partir du lactate lorsque stimulée par le glucagon, la phényléphrine et l'isoprotérénol chez des rats provenant de différents groupes d'âges.....	131
Figure 40: Effet de l'entraînement en endurance sur la réponse hormonale à l'exercice prolongé d'intensité modérée chez le Rat.....	132
Figure 41: Principales voies métaboliques menant à la formation de $^{13}\text{CO}_2$ à la bouche lorsque du glucose et des précurseurs néoglucogéniques marqués au ^{13}C sont ingérés au repos et à l'exercice.....	220
Figure 42: Principe de calcul de l'oxydation du glucose exogène, du glucose libéré par le foie et du glycogène musculaire lorsque du $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -glucose est ingéré.....	225
Figure 43: Schéma de la voie de la néoglucogénèse et de la navette malate-aspartate.....	229

LISTES DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

- ^{13}C -RMN:** Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du ^{13}C
- $^2\text{H}_2\text{O}$:** Eau deutérée
- $^3\text{H}_2\text{O}$:** Eau tritiée
- 2-PG:** 2-phosphoglycérate
- 3-MPA:** 3-mercapto-picolinate
- APE:** Atom Percent Excess
- AS:** Activité spécifique
- CAC:** Cycle de l'Acide Citrique
- CS:** Citrate Synthase
- DHA:** Dihydroxyacétone
- DHAP:** Dihydroxyacétone-phosphate
- DNID:** Diabétique non insulino-dépendant
- EI:** Enrichissement Isotopique
- F-6P:** Fructose-6P
- G-6P:** Glucose-6P
- GAP:** Glycéraldéhyde-3P
- GNG:** Néoglucogénèse
- IRM:** Imagerie par résonance magnétique
- JPC/JPDH:** Rapport du flux de la pyruvate carboxylase sur celui de la pyruvate deshydrogénase
- MCR:** Clairance métabolique
- MIDA:** Analyse de Distribution des Isotopomères de Masse
- $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$:** Bicarbonate marqué
- OAA:** Oxaloacétate
- PAGN:** Phénylacétyl-glutamine
- PC:** Pyruvate carboxylase
- PDH:** Pyruvate deshydrogénase
- PDB:** Pee Dee Belemnite
- PEP:** Phospho*enol*pyruvate
- PEPCK:** Phospho*enol*pyruvate carboxykinase

PK: Pyruvate kinase

R_a: Taux d'apparition

R_d: Taux de disparition

RER: Ratio Échanges Respiratoires

TP: Trioses-phosphate

VLDL: Lipoprotéine à très faible densité

V¹³CO₂: Volume de ¹³CO₂

VO₂max: Capacité aérobie maximale

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers François Péronnet, qui a dirigé mon travail et ma formation depuis ces sept dernières années. Avec le recul, je considère avoir trouvé en lui le meilleur guide qui soit, celui qui inspire le dépassement de soi.

Je remercie Denis Massicotte, co-directeur du laboratoire, pour son support constant, sa disponibilité et son dévouement.

Je suis très reconnaissant envers Xavier Leverve pour m'avoir accueilli dans son laboratoire à Grenoble. Devant tant de dynamisme et d'érudition, on n'a d'autres choix que d'apprendre.

Je remercie Christine Des Rosiers pour son aide précieuse concernant certains aspects de la revue de la littérature sur les méthodes de mesure de la néoglucogénèse.

J'aimerais également exprimer toute ma reconnaissance envers mes parents. Qu'ils trouvent dans cette thèse un hommage à leur dévouement et à leur support inconditionnel.

Finalement, je tiens à remercier ma petite famille, Sophie pour son amour indéfectible et ses encouragements dans les moments difficiles, et Charlotte pour ses sourires qui font oublier en un instant les journées grises et les pannes d'inspiration.

CHAPITRE 1: REVUE DE LA LITTÉRATURE

.1 Introduction

.1.1 Présentation des études expérimentales

Depuis 1984, le laboratoire de François Péronnet et Denis Massicotte a développé avec la collaboration du Laboratoire de géologie isotopique et géochronologique (GEOTOP) de l'Université du Québec à Montréal, une expertise dans l'étude du métabolisme des glucides à l'aide du traçage isotopique au ^{13}C chez l'Homme [Adopo et al., 1994; Guezennec et al., 1989; Massicotte et al., 1996; Massicotte et al., 1994; Massicotte et al., 1993; Massicotte et al., 1993a; Massicotte et al., 1992; Massicotte et al., 1990; Massicotte et al., 1989; Massicotte et al., 1986; Massicotte et al., 1984; Panteleev et al., 1999; Péronnet et al., 1998; Péronnet et al., 1993; Péronnet et al., 1993a; Péronnet et al., 1992; Péronnet et al., 1992a; Péronnet et al., 1992b; Péronnet et al., 1990]. Le programme de recherche du laboratoire, qui est subventionné depuis plusieurs années par le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et Génie du Canada, le Fond pour la formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche, l'Institut canadien pour la recherche sur la condition physique et le mode de vie, Sports Canada, les producteurs de pâtes de France, et la Fondation Isostar, porte sur l'oxydation de substrats énergétiques exogènes et ses répercussions sur la réponse neuroendocrine et métabolique, ainsi que sur l'utilisation des substrats endogènes pendant ou après l'exercice prolongé, ou suite à un exercice prolongé. Les quatre études rapportées dans cette thèse ont été effectuées au cours des cinq dernières années pendant lesquelles un passage direct de la Maîtrise au Doctorat a été effectué. Ces études se regroupent sous trois des principaux axes de recherche développés par le laboratoire pendant cette période.

.1.1.1 Oxydation de substrats exogènes à l'exercice

Un des premiers axes de recherche du laboratoire a été d'identifier les conditions (type de glucides ingérés, quantité, période d'ingestion etc...) qui maximisent l'utilisation des glucides exogènes à l'exercice. Les études menées au laboratoire depuis 1984 ont contribué à montrer que:

- 1) le taux d'oxydation du glucose exogène est lié à la puissance absolue du travail et à la quantité ingérée, et contribue entre 12 et 17 % à la fourniture d'énergie [Massicotte et al., 1992; Péronnet et al., 1992a];
- 2) l'ingestion et l'oxydation de glucose exogène ne s'accompagnent pas d'une diminution équivalente de l'oxydation du glucose endogène et augmentent donc la contribution totale de l'oxydation des glucides à la fourniture d'énergie [Massicotte et al., 1990; Péronnet et al., 1992a];
- 3) les polymères de glucose (y compris l'amidon) sont oxydés comme le glucose (il avait été suggéré qu'ils puissent être vidangés plus rapidement de l'estomac en raison de la plus faible pression osmotique qu'ils développent et soient plus rapidement disponibles pour l'oxydation: ce qui ne semble pas le cas) [Guezennec et al., 1989; Massicotte et al., 1989];
- 4) les acides gras à chaîne moyenne ainsi que l'éthanol sont beaucoup moins oxydés que ne le sont les glucides (Massicotte et al., 1992a; Massicotte et al., 1993);
- 5) le fructose, qui est absorbé plus lentement que le glucose et qui doit en grande partie être converti en glucose par le foie, est oxydé à un taux moindre que le glucose et n'économise pas les réserves endogènes de glucose lorsqu'il est ingéré pendant l'exercice (il avait été suggéré que la plus faible réponse de l'insuline, suite à l'ingestion de fructose, favoriserait l'utilisation des lipides et économiserait les réserves de glucides: ce qui ne semble pas le cas) [Massicotte et al., 1990; Massicotte et al., 1989; Massicotte et al., 1986].

Dans cette thèse, les résultats de deux études s'inscrivant sous cet axe de recherche sont présentés. La première étude visait, à mesurer l'oxydation respective de 25 g de ^{13}C -lactate et de 75 g de ^{13}C -glucose ingérés simultanément au cours de l'exercice et de comparer les taux d'oxydation obtenus avec ceux d'une quantité isocalorique de glucose (100 g). L'idée d'utiliser du lactate comme supplément énergétique exogène à l'exercice est basée sur un certain nombre d'études fondamentales portant sur le taux de renouvellement du lactate circulant [Brooks et Donovan, 1983], sur son rôle comme navette de carbones entre divers tissus [Brooks,

1986; Mazzeo et al., 1986; Stanley et al., 1988], ainsi que sur les propriétés du transporteur membranaire du lactate [Pilegaard et al., 1994; Roth, 1991]. Ces observations ont d'ailleurs été utilisées par certains producteurs de boissons énergétiques pour sportifs pour mettre sur le marché des boissons contenant du lactate (Cytomax®). Le but de l'étude était donc de vérifier si le lactate était oxydé de manière significative lorsqu'il est ingéré au cours de l'exercice.

Dans le même ordre d'idée, la deuxième étude visait à mesurer l'oxydation de ^{13}C -alanine et de ^{13}C -glycérol (25 g) ingérés en combinaison avec du glucose (25 g). Tout comme le lactate, ces deux substrats sont des précurseurs de la néoglucogénèse (GNG) dont l'apport pourrait favoriser la production hépatique de glucose. De plus, l'alanine [Biolo et al., 1997; Tipton et al., 1999] et le glycérol [Landau et al., 1996a; Previs et al., 1996] pourraient être également oxydés directement par les muscles squelettiques. Ces caractéristiques pourraient en faire des substrats exogènes préférables aux sels de lactate qui semblent assez mal tolérés par le tube digestif à cause de la forte pression osmotique qu'ils exercent [Fahey et al., 1991; Swensen et al., 1994].

.1.1.2 Mesure de l'oxydation du glycogène hépatique et musculaire à l'exercice

Depuis 1993, le laboratoire a développé un second axe de recherche visant à mesurer l'oxydation du glycogène musculaire et du glycogène hépatique au cours de l'exercice. La méthode envisagée a été l'enrichissement préalable des réserves de glycogène avec du ^{13}C -glucose. L'équipe de R.R. Wolfe à Galveston-Texas [Romijn et al., 1992] a en effet suggéré qu'il était possible d'enrichir artificiellement en ^{13}C l'ensemble des réserves de glycogène à l'aide d'une diète riche en glucides marqués au ^{13}C après un exercice ayant pour but de réduire les réserves de glycogène. Ces auteurs ont utilisé cette méthode pour calculer l'oxydation du glycogène, au cours d'un exercice de 30 min entre 80 et 85 % du VO_2max , à partir de l'enrichissement estimé des réserves de glycogène, de l'enrichissement des lipides et des protéines mesuré dans le plasma et de la consommation d'oxygène. L'oxydation du glycogène calculée à l'aide de cette méthode était identique à celle calculée à l'aide de la calorimétrie indirecte respiratoire

corrigée pour l'excrétion urinaire d'azote, suggérant que la méthode permettrait de marquer de façon sélective l'ensemble des réserves de glycogène (Tableau 1).

Le laboratoire de Tappy à Lausanne [Gay et al., 1994] a également montré qu'après quelques jours de diète contenant 55 % de glucides naturellement ou artificiellement enrichis en ^{13}C , le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du CO_2 expiré issu de l'oxydation du glucose au repos était équivalent au rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ des glucides de la diète. Cette observation a suggéré que l'enrichissement en ^{13}C du glycogène avait atteint l'enrichissement des glucides de la diète (Figure 1a). Étant donné que dans cette étude la diète n'était pas accompagnée d'exercice visant à une déplétion du glycogène musculaire, Gay et al. [1994] ont émis l'hypothèse que la diète riche en ^{13}C permettait d'enrichir sélectivement le glycogène hépatique. En guise de support à cette hypothèse, Gay et al. [1994] ont aussi mesuré le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du CO_2 expiré au cours d'un exercice. Contrairement à l'observation faite au repos, durant l'exercice l'enrichissement du CO_2 expiré issu de l'oxydation du glucose était environ 30 % inférieur à l'enrichissement en ^{13}C des glucides de la diète (Figure 1b). Ces auteurs ont suggéré que cette différence était due à l'oxydation de glycogène musculaire non marqué alors qu'au repos, le glycogène hépatique était la seule source de glucose pour l'oxydation (avec la calorimétrie indirecte respiratoire, la néoglucogénèse est considérée dans l'oxydation des lipides et des protéines). Par la suite, l'équipe de Tappy a publié deux études dans lesquelles cette méthode était mise à profit pour estimer la contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose au repos [Gay et al., 1994a; Müller et al., 1997]. Cette équipe a comparé l'enrichissement du glucose circulant à celui du glycogène hépatique qui est, selon les auteurs, identique à celui des glucides ingérés. Dans l'étude de Gay et al. [1994a] effectuée chez de jeunes sujets féminins, après cinq jours de diète, l'enrichissement du glucose circulant au repos après une nuit de jeûne correspondait à 49 ± 6 % de l'enrichissement des réserves de glycogène hépatique (Figure 2). La contribution estimée de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose était donc de 50 ± 5 %. Dans l'étude de Müller et al. [1997], la contribution de la néoglucogénèse à la fourniture de glucose circulant, au repos après une nuit de jeûne, était de 29 ± 8 % chez des patients non obèses et de 59 ± 10 % chez des patients obèses

Tableau 1: Oxydation du glucose et des acides gras mesurée au repos et à l'exercice, à l'aide de la calorimétrie indirecte respiratoire et de l'enrichissement en ^{13}C du CO_2 expiré et des substrats énergétiques.

Sujet	Glucose (g)		Acides gras (g)	
	Cal. ind. Resp.	Ratio $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	Cal. ind. Resp.	Ratio $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$
1	60,48	59,41	2,92	3,37
2	36,83	29,89	5,78	8,62
3	33,98	32,99	8,38	8,80
4	37,00	38,02	9,74	9,34
5	22,49	30,44	11,25	8,03
6	45,71	59,38	5,77	3,22
Moyenne \pm SEM	39,42 \pm 5,20	41,69 \pm 5,72	7,31 \pm 1,25	3,90 \pm 1,15

Cal. Ind. Resp.: Les valeurs ont été calculées à partir de la mesure du VO_2 et du VCO_2 ainsi que de l'excrétion urinaire d'azote.

Ratio $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: Les valeurs ont été calculées à partir de l'enrichissement en ^{13}C du glucose de la diète ainsi que du glucose, des acides gras libres et des protéines plasmatiques.

Les données sont extraites de l'article de Romijn et al. [1992].

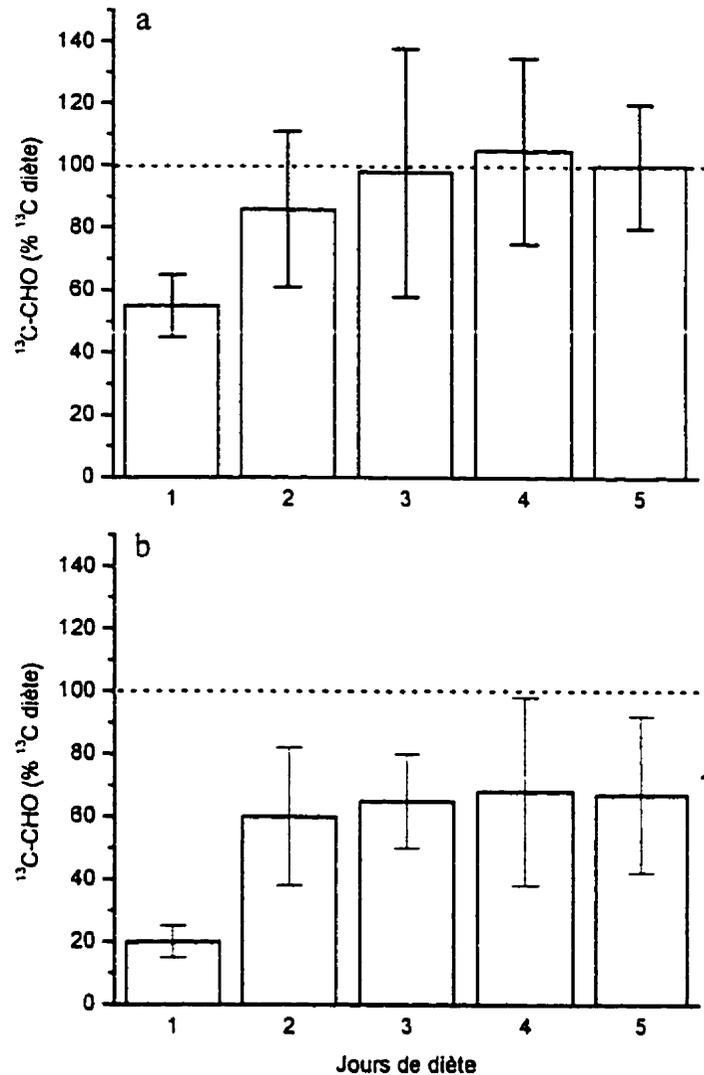


Figure 1: Enrichissement en ^{13}C du CO_2 issu de l'oxydation du glucose endogène au repos et à l'exercice lorsqu'une diète contenant des glucides enrichis en ^{13}C est imposée. Cette figure est extraite de l'étude de Gay et al. [1994] dans laquelle 10 sujets ont été soumis pendant 5 jours à une diète isocalorique (55 % glucides, 30 % lipides, 15 % protéines) contenant des glucides naturellement riches en ^{13}C (maïs) de façon à enrichir sélectivement le glycogène. À chaque jours l'enrichissement en ^{13}C du CO_2 issu de l'oxydation des glucides était mesuré au repos (a) et au cours d'un exercice de 45 min à faible puissance (b). Les résultats sont rapportés en pourcentage de l'enrichissement des glucides contenus dans la diète.

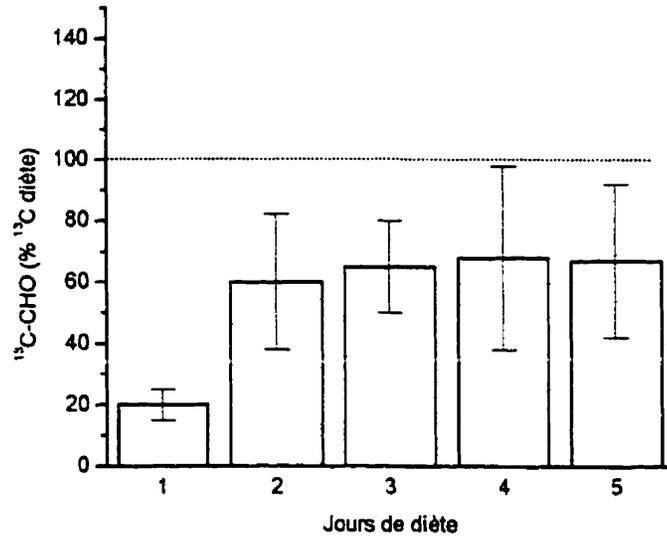


Figure 2: Enrichissement en ¹³C du glucose circulant au repos en situation postprandiale lorsqu'une diète contenant des glucides enrichis en ¹³C est imposée. Cette figure est extraite de l'étude de Gay et al. [1994a] dans laquelle le glycogène a été enrichi selon la méthode proposée par Gay et al. [1994] (voir Figure 1). L'enrichissement en ¹³C du glucose circulant est exprimé en % de l'enrichissement des glucides contenus dans la diète, qui est théoriquement équivalent à l'enrichissement du glycogène hépatique. La contribution de la néoglucogénèse est obtenue en faisant le rapport ($[\text{^{13}\text{C}/\text{^{12}\text{C} \text{ glucose plasmatique}] / [\text{^{13}\text{C}/\text{^{12}\text{C} \text{ glycogène hépatique}] \times 100}}}}$).

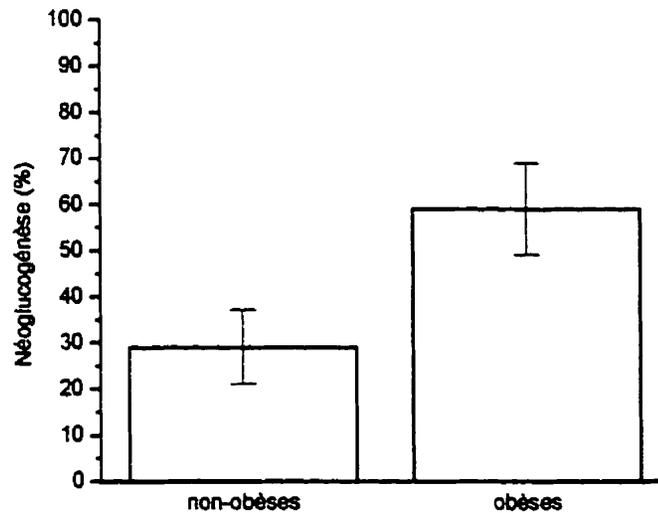


Figure 3: Contribution relative de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose chez des sujets sains et obèses à l'état postprandial. Cette figure est extraite de l'étude de Müller et al. [1997] dans laquelle la méthode proposée par Gay et al. [1994a].

(Figure 3). Dans cette même étude [Müller et al., 1997], les sujets étaient constitués de patients devant subir une chirurgie abdominale (pour des pathologies non reliées au foie). Ceci a donc permis d'effectuer une biopsie hépatique pour comparer l'enrichissement du glycogène estimé à partir du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du CO_2 et l'enrichissement réel mesuré à partir de l'échantillon de tissu hépatique. Contrairement à l'hypothèse de départ, ces auteurs ont observé que l'enrichissement isotopique réel du glycogène hépatique était de 66 à 80 % inférieur à l'enrichissement du glycogène calculé à partir du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ dans le CO_2 expiré. De plus, l'enrichissement du glycogène était inférieur à l'enrichissement du glucose circulant (0,002 vs 0,035 APE). Ces résultats remettent en cause 1) la possibilité d'enrichir le glycogène hépatique à un niveau équivalent à celui des glucides de la diète, et 2) l'hypothèse que le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du CO_2 issu de l'oxydation du glucose représente de façon spécifique l'enrichissement en ^{13}C du glycogène hépatique. Pour expliquer ces résultats contradictoires, Müller et al. [1997] ont cependant émis l'hypothèse que deux pools de glycogène hépatique pouvaient exister: un premier pool à renouvellement lent qui ne s'enrichirait pas en ^{13}C et ne contribuerait pas à la production hépatique de glucose, et un second pool à renouvellement rapide dont le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ serait égal à celui des glucides de la diète. Cependant, à défaut de pouvoir vérifier ces hypothèses, il est possible que les résultats plausibles de la contribution de la néoglucogénèse qui ont été obtenus jusqu'à maintenant à l'aide de cette méthode soient un artefact.

En 1993, la possibilité d'enrichir en ^{13}C de façon sélective ou non les réserves de glycogène hépatique et/ou musculaire nous est apparue très intéressante. En effet, il n'existe toujours pas de méthode simple et non invasive permettant de mesurer l'oxydation des différentes réserves de glycogène et d'estimer la contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose à l'exercice. Au cours d'une étude pilote, nous avons donc soumis un groupe d'hommes à un exercice prolongé visant à une déplétion des réserves de glycogène hépatique et musculaire. Ces sujets ont ensuite suivi pendant quelques jours une diète à base de riz artificiellement enrichi avec du $[\text{U } ^{13}\text{C}_6]\text{-glucose}$ dans le but d'enrichir en ^{13}C le glycogène hépatique et musculaire. Lors d'un exercice subséquent, l'oxydation des substrats a été mesurée par calorimétrie indirecte

respiratoire corrigée pour l'oxydation des protéines. L'oxydation du glycogène a également été calculée à partir du VCO_2 , du rapport $^{13}C/^{12}C$ des glucides de la diète et du CO_2 expiré à la bouche en utilisant une méthode similaire à celle suggérée par Romijn et al. [1992]. Cette étude pilote a permis de confirmer les données de Romijn et al. [1992] en montrant que, l'oxydation du glycogène total (hépatique et musculaire) calculée à l'aide du traçage isotopique était similaire à la valeur obtenue par calorimétrie indirecte respiratoire.

Dans une seconde étude pilote menée chez l'Homme, nous avons tenté d'enrichir sélectivement en ^{13}C les réserves de glycogène hépatique ou musculaire pour en mesurer l'oxydation à l'exercice ainsi que pour estimer la contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose tel que l'a proposé Gay et al. [1994a]. La procédure utilisée pour l'enrichissement sélectif du glycogène musculaire ou hépatique était la suivante:

- 1) déplétion des réserves musculaire et hépatique par un exercice prolongé et un régime pauvre en glucides;
- 2) restauration des réserves par un régime riche en glucides;
- 3) déplétion sélective des réserves hépatiques par un jeûne et un régime pauvre en glucides;
- 4) restauration sélective des réserves hépatiques par un repas riche en glucides.

Pour marquer les réserves de glycogène musculaire ou hépatique, les glucides ingérés en (2) ou en (4) étaient artificiellement enrichis en ^{13}C . L'oxydation du glycogène a été calculée à partir du $V^{13}CO_2$ au cours d'un exercice de 120 min. à 65 % du VO_2 max. La contribution de la néoglucogénèse a été calculée à partir du rapport $^{13}C/^{12}C$ du glucose circulant et des glucides de la diète. Les résultats concernant l'oxydation du glycogène ont été présentés sous forme de résumés [Odermatt et al. 1995; Odermatt et al., 1995a] car ils semblaient encourageant. En effet, l'oxydation du glycogène hépatique et musculaire, au cours de l'exercice, était de 72 et 209 g respectivement. Ces valeurs étaient compatibles avec les concentrations moyennes et les taux d'utilisation généralement acceptés pour les réserves de glycogène hépatique et

musculaire [Ahlborg et al., 1974; Ahlborg et Felig, 1982; Ahlborg et Felig, 1977; Coggan et Coyle, 1991]. Toutefois, l'étude n'est pas rapportée en détail dans cette thèse et ne fera pas l'objet d'un manuscrit car une analyse plus précise a montré que la méthode présentait quelques problèmes. En effet, la contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose, calculée à partir du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du glucose circulant et des glucides de la diète, s'est avérée incohérente. Dans les conditions expérimentales où le glycogène musculaire avait été enrichi, la contribution de la néoglucogénèse était d'environ 15 %, ce qui est une valeur plausible (voir section 3.1.2.2). Cependant, lorsque le glycogène hépatique a été enrichi, une contribution de plus de 100 % a été obtenue. Ces résultats ont remis en cause la possibilité d'enrichir sélectivement le glycogène hépatique ou musculaire à un niveau d'enrichissement voisin de celui des glucides de la diète. Une explication possible est que des phénomènes de dilution et de recyclage font en sorte que 1) l'enrichissement en ^{13}C du glycogène est inférieur à celui des glucides de la diète et, 2) des isotopes sont incorporés à la fois dans le glycogène musculaire et dans le glycogène hépatique.

De façon à vérifier l'hypothèse que l'enrichissement du glycogène puisse atteindre celui des glucides de la diète, nous avons récemment mesuré l'enrichissement en ^{13}C du glycogène hépatique et musculaire chez des Rats soumis à différents types de diète. Le matin, les animaux ont d'abord été soumis à un exercice de natation visant à une déplétion des réserves de glycogène. Ensuite, pendant toute la journée et la nuit d'après, une des diètes suivantes a été administrée: 1) $[\text{U}^{13}\text{C}_6]$ -glucose à deux niveaux d'enrichissement différents; 2) $[\text{U}^{13}\text{C}_6]$ -fructose; 3) $[\text{U}^{13}\text{C}_6]$ -galactose; 4) maïs. La diète au maïs a également été poursuivie pendant cinq jours de façon à reproduire le protocole utilisé par Gay et al. [1994]. Les résultats ont montré que l'enrichissement des réserves de glycogène hépatique était significativement inférieur à l'enrichissement des glucides administrés pour l'ensemble des conditions expérimentales testées, même dans le cas où la diète au maïs avait été poursuivie pendant cinq jours (Figure 4). Dans la mesure où l'analyse des résultats de cette étude est en cours, ils ne sont pas présentés dans la thèse. Toutefois les résultats indiquent qu'à priori, l'idée de marquer uniformément les réserves de hépatique par une simple diète contenant des glucides riches en ^{13}C n'est pas

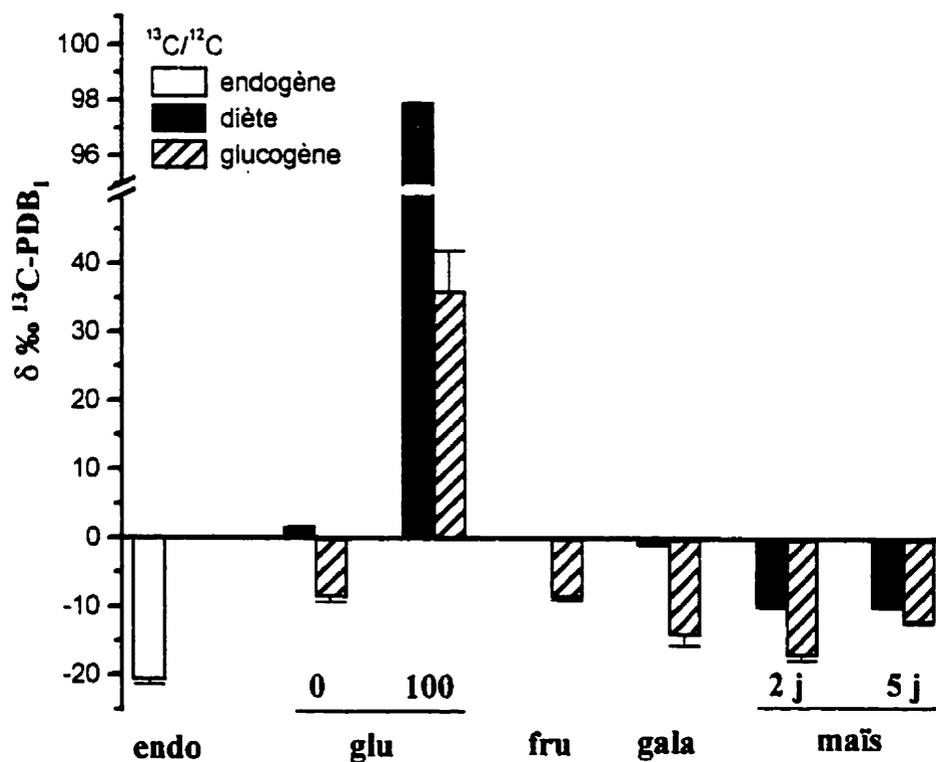


Figure 4: Enrichissement en ^{13}C des réserves de glycogène hépatique chez le Rat soumis à un exercice de déplétion suivi d'une diète glucidique riche en ^{13}C . La figure présente le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du glycogène hépatique avant et après l'administration de différentes diètes enrichies en ^{13}C . Endo : rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du glycogène avant l'administration des diètes, glu : glucose, fru : fructose, gala : galactose.

aussi simple qu'elle ne pouvait le sembler. La validité de la méthode proposée par Gay et al. (1994a) reste donc à démontrer. D'autres études notamment sur les mécanismes de restauration du glycogène dans les deux types de tissus sont nécessaires.

Au cours de ce programme de Doctorat, une quantité importante de travail expérimental aura donc été effectué pour tenter de mettre au point une méthode non invasive de mesure d'oxydation du glycogène hépatique et musculaire à l'exercice. Malheureusement, ceci n'a pas mené à des résultats concluants pouvant être publiés.

1.1.3 Effets de l'entraînement sur le métabolisme du glucose

Dans la suite logique des études visant à déterminer quels sont les facteurs qui maximisent l'oxydation des glucides exogènes à l'exercice, le Laboratoire s'est intéressé à l'effet que pouvait avoir l'entraînement en endurance sur la capacité à oxyder du glucose exogène. En effet, même s'il est bien connu que l'entraînement diminue l'oxydation du glucose circulant et du glycogène musculaire au profit d'une oxydation accrue des acides gras [Brooks et Mercier, 1994; Holloszy et Coyle, 1984], l'entraînement est également associé à une meilleure tolérance au glucose, à une sensibilité accrue à l'insuline [Dela et al., 1996], ainsi qu'à une capacité supérieure de transport non-insulino-dépendant du glucose dans le muscle squelettique [Tokuyama et al., 1993].

Dans la troisième étude présentée dans cette thèse, la mesure de l'oxydation d'une charge de glucose exogène a donc été effectuée par traçage au ^{13}C chez des sujets sédentaires et entraînés au repos et lors d'un exercice prolongé. De façon à faire une comparaison complète à l'exercice, les deux groupes de sujets ont d'abord effectué un exercice à la même puissance relative. Une semaine plus tard, les sujets entraînés effectuaient un second exercice, mais à la même puissance absolue que les sujets sédentaires. L'hypothèse était que malgré leur dépendance accrue envers les acides gras comme substrat énergétique, les sujets entraînés oxyderaient plus de glucose exogène lorsqu'il est ingéré en grande quantité.

Dans le même axe de recherche, nous nous sommes également intéressés à l'étude des adaptations du foie à l'entraînement en endurance en utilisant des modèles *in vitro*. En collaboration avec Carole Lavoie de l'Université du Québec à Trois-Rivières, le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) l'entraînement augmente la sensibilité hépatique au glucagon est(sont) investigué(s) avec un modèle de foie perfusé *in situ* chez le Rat. De plus, au cours d'un long séjour effectué au Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée de Grenoble, les mécanismes intracellulaires d'adaptation de la voie néoglucogénique à l'entraînement ont également été étudiés.

Plusieurs études *in vivo* [Donovan et al., 1990; Turcotte et al., 1990] et *in vitro* [Donovan et al., 1997; Podolin et al., 1994; Sumida et al., 1995; Sumida et al., 1993] ont en effet montré que l'entraînement en endurance augmentait la capacité néoglucogénique du foie, principalement à partir du lactate et de l'alanine. Cependant, les mécanismes cellulaires impliqués dans l'augmentation du flux de la néoglucogénèse à partir de ces deux précurseurs sont encore mal connus. Sumida et al. [1993] ont suggéré que l'augmentation de la néoglucogénèse à partir du lactate et de l'alanine pourrait être expliquée par un(des) mécanisme(s) commun(s), sans toutefois pouvoir le(s) démontrer. Le but de la quatrième étude présentée dans la thèse était donc d'étudier plus en profondeur les mécanismes cellulaires impliqués dans l'augmentation de la capacité néoglucogénique à partir de différents précurseurs glucoformateurs, plus particulièrement à partir de l'alanine. Pour ce faire, un modèle d'hépatocytes isolés incubés ou périfusés a été utilisé. La technique de périfusion, développée par Van der Meer et Tager [1976] et qui est couramment utilisée au Laboratoire de Bioénergétique fondamentale et appliquée [Argaud et al., 1991; Argaud et al., 1993; Leverve et al., 1985; Rigoulet et al., 1987], est une des méthodes de choix pour l'étude des mécanismes de régulation des voies métaboliques. Elle permet en effet d'obtenir, à partir d'une suspension cellulaires d'hépatocytes isolés, des états stationnaires pour des concentrations non saturantes de substrat, tout en bénéficiant des avantages de l'utilisation de cellules isolées. Il est ainsi possible de faire varier le flux à travers la voie néoglucogénique en modifiant la concentration de substrat et en déterminant simultanément la concentration des intermédiaires intracellulaires.

.1.2 Présentation de la revue de la littérature

Étant donné la diversité des études incluses dans cette thèse, il est difficile de chercher à couvrir dans la revue de la littérature l'ensemble des données disponibles pour chacun des thèmes abordés. La littérature concernant l'oxydation de substrats énergétiques exogènes et leurs répercussions sur la réponse neuroendocrine et métabolique, ainsi que sur l'utilisation des substrats endogènes à l'exercice prolongé, a fait l'objet de plusieurs méta-analyses [Coggan et Coyle, 1991; Hawley et al., 1992; Sherman et Lamb, 1988] dont certaines issues du laboratoire [Adopo, 1993 ; Péronnet et al., 1992a ; Péronnet et al., 1992c]. Pour cette raison, il était inutile de revoir ce sujet à nouveau. La revue de la littérature est donc essentiellement axée sur la néoglucogénèse. Ce choix est d'abord justifié par le fait que nous nous sommes intéressés à l'étude des mécanismes par lesquels l'entraînement modifie les capacités néoglucogéniques du foie. Il est également justifié par le fait que dans les études portant sur l'oxydation du lactate, de l'alanine et du glycérol marqués au ^{13}C , l'enrichissement isotopique du glucose circulant a été mesuré de façon à apprécier quel était le devenir majeur de ces précurseurs exogènes à l'exercice: oxydation directe ou conversion préalable en glucose. Enfin, nous avons également tenté de développer une technique permettant d'estimer la contribution du glucose néoformé à la fourniture d'énergie lors d'efforts prolongés, malheureusement sans succès.

La revue de la littérature est divisée en trois grandes sections. La première est consacrée à une synthèse critique des différentes méthodes actuellement disponibles pour l'investigation de la néoglucogénèse *in vivo* car il n'existe pas de revue de la littérature complète sur l'ensemble de ces méthodes. De plus, plusieurs des techniques utilisées sont excessivement complexes; ce qui rend très difficile l'appréciation critique des résultats disponibles dans la littérature, qui sont par ailleurs très variables.

La deuxième section est principalement consacrée à la synthèse des études portant sur la production hépatique de glucose à l'exercice et à la contribution respective de la glycolyse et de la néoglucogénèse chez l'Homme et l'animal. Une section, bien que moins importante, porte également sur les résultats de récentes études montrant

que la contribution de la néoglucogénèse au repos est beaucoup plus importante qu'on ne le pensait initialement.

La troisième section est, quant à elle, consacrée à la synthèse des données disponibles concernant les adaptations du métabolisme hépatique du glucose à l'entraînement en endurance chez l'Homme et le Rat. Les modifications induites par l'entraînement semblent en partie différentes chez ces deux espèces. Un débat actuel concerne l'importance du rôle joué par l'augmentation de la capacité néoglucogénique dans l'accroissement de la capacité de travail induite par l'entraînement.

.2 Méthodes d'investigation de la néoglucogénèse *in vivo*

L'ensemble des techniques disponibles pour l'étude de la néoglucogénèse *in vivo* peut être divisé en trois grandes catégories. La première catégorie regroupe les trois techniques classiques que sont la différence artério-veineuse hépatique, la biopsie hépatique à l'aiguille et la mesure de l'incorporation dans le glucose de ^{13}C ou ^{14}C issu de précurseurs néoglucogéniques ou de bicarbonates marqués infusés. La deuxième catégorie regroupe l'ensemble des méthodes isotopiques basées sur des modèles du cycle de l'acide citrique (CAC) et de la néoglucogénèse. Ces modèles ont été développés pour tenir compte des phénomènes d'échanges et de dilution des isotopes, qui constituent la grande limite des méthodes isotopiques standards d'infusion de précurseurs marqués. Les méthodes, telles que l'infusion de ^{14}C -acétate, l'analyse d'isotopomères de masse du glucose lors d'une infusion de $[\text{U}^{13}\text{C}_6]$ -glucose, ainsi que la biopsie chimique au phényl-acétate de la glutamine hépatique, font partie de cette catégorie. Enfin, la troisième catégorie est constituée des méthodes isotopiques ne nécessitant pas de modèle de correction pour les échanges et la dilution isotopique dans le cycle de Krebs. Il s'agit de 1) l'analyse de distribution des isotopomères de masse du glucose (ADIM); 2) l'ingestion d'eau deutérée ($^2\text{H}_2\text{O}$); 3) la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du ^{13}C -glycogène (^{13}C -RMN) couplée à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et 4) la méthode d'enrichissement préalable des réserves de glycogène ou méthode de Gay.

.2.1 Techniques classiques

.2.1.1 Différence artério-veineuse hépatique

Entre 1970 et 1980 une série d'études classiques pour la plupart d'origine Scandinave ont rapporté, à l'aide de la différence artério-veineuse hépatique, des mesures quantitatives de la contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose au repos ainsi qu'à l'exercice chez l'Homme [Ahlborg et Björkman, 1990; Ahlborg et al., 1986; Ahlborg et Felig, 1982; Ahlborg et Felig, 1977; Ahlborg et al., 1974; Björkman et Eriksson, 1983; Björkman et al., 1981; Chiasson et al., 1980; Chiasson et al., 1975; Mæhlum et al., 1976; Sestoft et al., 1977; Toftegaard et Thomsen,

1979; Wahren et al., 1975; Wahren et al., 1971]. Cette technique a été peu utilisée par la suite à cause de son caractère invasif. Néanmoins, les études qui ont mis à profit cette méthode ont contribué de façon importante à notre compréhension du métabolisme glucidique du foie en réponse au jeûne prolongé [Björkman et Eriksson, 1983], à l'ingestion de glucose [Ahlborg et Felig, 1982] et de fructose [Ahlborg et Björkman, 1990], en réponse à l'insuline [Chiasson et al., 1980] et au glucagon [Björkman et al., 1981; Chiasson et al., 1975], ainsi que dans un état pathologique comme le diabète [Sestoft et al., 1977; Wahren et al., 1975]. De plus, dans certaines études, l'utilisation simultanée de la balance artério-veineuse hépatique et musculaire a permis d'évaluer les échanges de précurseurs néoglucogéniques entre le muscle et le foie [Ahlborg et Björkman, 1990; Ahlborg et al., 1986; Ahlborg et Felig, 1982; Ahlborg et Felig, 1977; Ahlborg et al., 1974; Toftegaard et Thomsen, 1979; Wahren et al., 1975]. Sous ses aspects pratiques, cette technique nécessite la pose d'un cathéter au niveau d'une artère et d'une veine hépatique sous contrôle fluoroscopique. Des prélèvements séquentiels de sang au niveau de l'artère et de la veine hépatique permettent de calculer la différence de concentration artério-veineuse pour chacun des substrats mesurés. Le couplage de la différence de concentration artério-veineuse et du débit sanguin hépatique mesuré par dilution permet de calculer différents flux. Dans toutes les études rapportées, le débit sanguin hépatique a été mesuré par dilution du vert d'indocyanide infusé à débit constant, soit dans une veine soit dans une artère.

La balance artério-veineuse hépatique présente plusieurs aspects intéressants. Cette technique permet l'accès à des informations multiples et variées à un moment précis dans le temps. Elle permet de mesurer à la fois des extractions (oxygène et précurseurs glucoformateurs) et des flux (consommation d'oxygène, flux néoglucogénique, production hépatique de glucose), ce qui constitue une caractéristique unique. La possibilité d'estimer la néoglucogénèse à partir de plusieurs précurseurs de façon simultanée, constitue également une caractéristique intéressante.

Cependant, la mesure de la néoglucogénèse par différence artério-veineuse hépatique présente des limites qu'il est important de considérer. La première limite est

l'hypothèse que la masse de glucose issue de la néoglucogénèse correspond à la somme des masses nettes de précurseurs glucoformateurs extraits par le foie, c'est à dire que tous les précurseurs captés par le foie sont transformés en glucose, et libéré en circulation [Chiasson et al., 1977]. La deuxième limite est que l'extraction hépatique des précurseurs néoglucogéniques acheminés au foie par la veine porte n'est pas comptabilisée [Chiasson et al., 1977]. Toutefois, ceci ne mène pas à une grande sous-estimation de l'extraction nette réelle des précurseurs glucoformateurs circulants par le foie puisque chez le Chien [Abumrad et al., 1982] et l'Homme [Björkman et al., 1990], l'intestin libère relativement peu de précurseurs. La troisième limite est que la mesure du flux néoglucogénique repose sur des calculs effectués à partir de taux nets d'extraction et de production par le tissu splanchnique. Étant donné que le foie peut capter et libérer de façon simultanée des précurseurs et du glucose, les valeurs nettes d'extraction et de production des précurseurs glucoformateurs et du glucose respectivement peuvent être inférieures aux extractions et productions réelles. La quatrième limite est que la néoglucogénèse à partir de précurseurs intra-hépatiques n'est pas comptabilisée [Petersen et al., 1996].

Dans l'ensemble, certains auteurs [Wasserman et al., 1993; Chiasson et al., 1977] ont initialement conclu que la balance hépatique permettait d'obtenir une estimation maximale de la contribution de la néoglucogénèse, principalement à cause de l'hypothèse que 100 % des précurseurs extraits étaient convertis en glucose puis libérés en circulation. Cependant, certaines limites techniques mentionnées précédemment mènent, quant à elles, à une sous-estimation de la contribution réelle de la néoglucogénèse. En fait, plusieurs études récentes [Laudau et al., 1996; Peterssen et al., 1996] menées à l'aide de méthodes plus sophistiquées montrent que la technique de la différence artério-veineuse, contrairement aux hypothèses initiales, sous-estime de façon importante la contribution de la néoglucogénèse. Malgré cette limite, la balance hépatique est une technique de choix pour l'étude du métabolisme hépatique du glucose parce qu'elle donne accès à certaines informations uniques, telles la consommation d'oxygène hépatique et les taux d'extraction de plusieurs métabolites de façon simultanée.

2.1.2 Biopsie hépatique

Très peu d'études [Hultman et Nilsson, 1971; Nilsson et Hultman, 1974; Nilsson, 1973; Nilsson et al., 1973a; Nilsson et Hultman, 1973b] ont utilisé la biopsie à l'aiguille afin d'étudier le métabolisme du glycogène hépatique pour des raisons éthiques évidentes. Seul le groupe de chercheurs de Nilsson et Hultman a mis à profit cette technique pour mesurer la concentration de glycogène en période post-absorptive [Nilsson, 1973], à la suite d'un jeûne total [Nilsson et Hultman, 1973b], après le suivi de différents types de diètes [Nilsson et al., 1973a], à la suite d'une infusion de glucose ou de fructose [Nilsson et Hultman, 1974] et enfin, à la suite d'un exercice [Hultman et Nilsson, 1971]. L'étude de Nilsson et al. [1973a] est cependant la seule qui a calculé la contribution respective de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose. Dans cette étude, la biopsie hépatique sériée a en effet été combinée à la différence artérioveineuse hépatique; ce qui a permis de mesurer les échanges splanchniques et la concentration de glycogène de façon simultanée. (Sous ses aspects pratiques) Le foie est repéré par fluoroscopie et la biopsie hépatique est effectuée à l'aide d'une aiguille de 1,2 à 1,4 mm fixée à une seringue contenant 3 mL d'une solution saline à 4°C. Après une anesthésie cutanée locale, l'aiguille est introduite par la voie intercostale. Un échantillon de tissu, dont la masse varie entre 5 et 20 mg, est directement aspiré dans la solution saline [Nilsson, 1973], ce qui est suffisant pour faire 2 à 3 aliquots. Cette technique a permis de montrer que l'activité glycogénolytique du tissu après le prélèvement était très faible et ne contribuait pas à sous-estimer la concentration de glycogène hépatique [Nilsson, 1973].

Dans les quelques études qui ont utilisé cette technique, des prélèvements sériés de tissu hépatique ont été effectués pour déterminer des flux glycogénolytiques moyens au cours d'une période de temps donnée. Sous-jacent à l'utilisation de prélèvements sériés, l'hypothèse est que la concentration de glycogène hépatique est similaire au sein de tous les lobes du foie ainsi que d'une région à l'autre d'un même lobe. Cette hypothèse est supportée par les résultats d'études chez l'animal et chez l'Homme (lors d'autopsies) montrant une homogénéité de la concentration de glycogène dans les différents lobes hépatiques [Popper et Wozasek, 1931; Swensson, 1945]. De plus,

Nilsson [1973] a rapporté des concentrations de glycogène similaires dans deux échantillons de biopsie prélevés à cinq minutes d'intervalle à deux endroits différents. Cette observation de Nilsson [1973] n'exclut cependant pas que le métabolisme du glycogène soit zoné au sein des acinus hépatiques entre la région périportale et périveineuse [Jungermann et Kietzmann, 1996]. Elle(s) confirme(nt) simplement l'observation que la zonation métabolique du foie n'est pas macroscopique.

Une autre hypothèse sous-jacente aux prélèvements sériés pour calculer un flux glycolytique moyen est que la biopsie n'induit pas de perturbations neuroendocrines susceptibles d'augmenter la contribution de la glycolyse à la production hépatique de glucose. En effet, l'adrénaline est un puissant stimulant de la glycolyse et le stress associé au prélèvement pourrait faire augmenter la concentration de glucose. Toutefois, sur la base d'une absence d'élévation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque lors des prélèvements de tissus, Nilsson [1973] a conclu que la stimulation du système sympathique était probablement faible.

Une des limites majeures de la biopsie hépatique est qu'elle permet seulement de déterminer la concentration de glycogène par gramme de tissu. Pour calculer la contribution de la glycolyse à la production hépatique de glucose il est donc nécessaire d'utiliser une estimation de la masse du foie. Dans la plupart des études qui ont utilisé cette technique pour mesurer la contribution de la glycolyse hépatique à la production de glucose [Hultman et Nilsson, 1971; Nilsson et al., 1973a; Nilsson et Hultman, 1973b], une masse hépatique estimée (1800 g ou mL), déterminée à partir de données morphométriques obtenues sur des cadavres, a été utilisée. Or, de récentes données, obtenues par imagerie de résonance magnétique, ont montré que cette masse hépatique estimée était supérieure à la masse hépatique moyenne (environ 1,5 L) mesurée chez des sujets vivants et sains [Petersen et al., 1996; Rothman et al., 1991]. Par conséquent, la contribution de la glycolyse rapportée dans ces études [Hultman et Nilsson, 1971; Nilsson et al., 1973a; Nilsson et Hultman, 1973b], est surestimée. Cette surestimation de la contribution de la glycolyse résulte donc en une sous-estimation de la contribution de la néoglucogénèse lorsque celle-ci est calculée

par différence entre la production hépatique de glucose (mesurée à l'aide de la différence artériovoineuse ou de traceurs isotopiques) et le flux glycolytique moyen.

2.1.3 Infusion de précurseurs néoglucogéniques marqués au ^{14}C ou au ^{13}C

L'administration de précurseurs néoglucogéniques marqués avec un isotope stable (^{13}C) ou radioactif (^{14}C) du carbone a été abondamment utilisée pour l'étude de la néoglucogénèse tant chez l'animal que chez l'humain. L'infusion de précurseurs marqués a été couplée à des modèles et des méthodes d'analyse plus ou moins complexes pour le calcul de la contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose [Chiasson et al., 1977; Consoli et al., 1990; Consoli et al., 1990a; Diraison et al., 1998]. Dans sa version classique, qui est la plus simple, le flux de la néoglucogénèse est déterminé en comparant directement l'enrichissement isotopique (^{13}C) ou l'activité spécifique (^{14}C) du précurseur marqué et du glucose dans le sang artériel à l'état stable. Lorsqu'un état stable d'enrichissement isotopique est atteint l'équation suivante permet donc de déterminer le flux de la néoglucogénèse:

Équation 1:

$$\mu\text{mole de précurseur incorporé / min} = \text{EI glucose (\%)} / \text{EI précurseur (\%)} \times \text{Temps (min)}$$

où EI (%) est l'enrichissement isotopique du glucose et du précurseur sélectionné dans le plasma à l'état stable [Chiasson et al., 1977; Hetenyi, 1982].

Bien que cette technique soit encore utilisée aujourd'hui [Chiasson et al., 1997; Stumvoll et al., 1998; Stumvoll et al., 1996], il est maintenant bien acquis qu'elle n'est pas quantitative mais constitue, au mieux, un index grossier de la néoglucogénèse à partir du précurseur étudié. Ceci est dû à trois importantes limites méthodologiques. La première est que des échanges non négligeables de carbones ont lieu entre certains pools de précurseurs néoglucogéniques. Il est donc impossible de dire que l'incorporation d'isotopes dans le glucose représente réellement la contribution du précurseur étudié à la production de glucose [Hetenyi et al., 1980]. En effet, Hetenyi et al. [1980] ont montré que lorsque du $[\text{U } ^{13}\text{C}_3]\text{-alanine}$ était infusé chez le Chien, 46 % des carbones de l'alanine incorporés dans le glucose avaient préalablement transité dans le pool de lactate. Cette limite a une conséquence évidente: il est impossible de calculer la

contribution totale de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose en faisant la somme de la contribution de chacun des précurseurs marqués mesurée dans des expériences différentes.

La deuxième limite est que l'enrichissement isotopique réel du pyruvate intra-hépatique, lorsque des précurseurs marqués tels le lactate et l'alanine sont administrés, est inconnu. En effet, l'enrichissement isotopique du précurseur mesuré dans le sang artériel n'est pas représentatif de l'enrichissement isotopique du pyruvate intra-hépatique à cause d'un phénomène de dilution par des précurseurs endogènes [Diraison et al., 1998; Landau et al., 1995b; Large et al., 1995]. Ainsi, l'utilisation de l'enrichissement isotopique du précurseur mesuré dans le sang artériel amène à une sous-estimation de la contribution de la GNG. Cette sous-estimation de la néoglucogénèse est d'autant plus importante que la dilution du pyruvate, marqué par des précurseurs endogènes non marqués, est grande.

La troisième limite est l'existence d'échanges de carbones au niveau du pool d'oxaloacétate (OAA) mitochondrial, due au croisement de la voie de la néoglucogénèse avec celle du CAC [Hetenyi, 1982]. Dans ces échanges, les atomes de ^{13}C (ou ^{14}C) provenant du précurseur marqué (lactate, pyruvate ou alanine), sont perdus sous forme de $^{13}\text{CO}_2$ (ou $^{14}\text{CO}_2$) et remplacés par des atomes de ^{12}C provenant de l'acétyl-CoA (Figure 5). De ce fait, l'enrichissement isotopique (ou l'activité spécifique) du phosphoenolpyruvate (PEP) et donc du glucose synthétisé est inférieur à celui du traceur néoglucogénique, entraînant une sous-estimation de la néoglucogénèse. Les méthodes mises au point pour quantifier ces échanges seront abordées à la section 2.2.

2.1.4 Infusion de ^{13}C ou ^{14}C -bicarbonates

L'infusion de bicarbonates marqués ($\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$) a été employée chez l'Homme au repos pour étudier la néoglucogénèse [McMahon et al., 1989] et la voie indirecte de synthèse du glycogène hépatique après ingestion de glucose [Radziuk, 1989a]. Cette méthode a également été utilisée par Coggan et al. [1995] pour étudier l'effet de

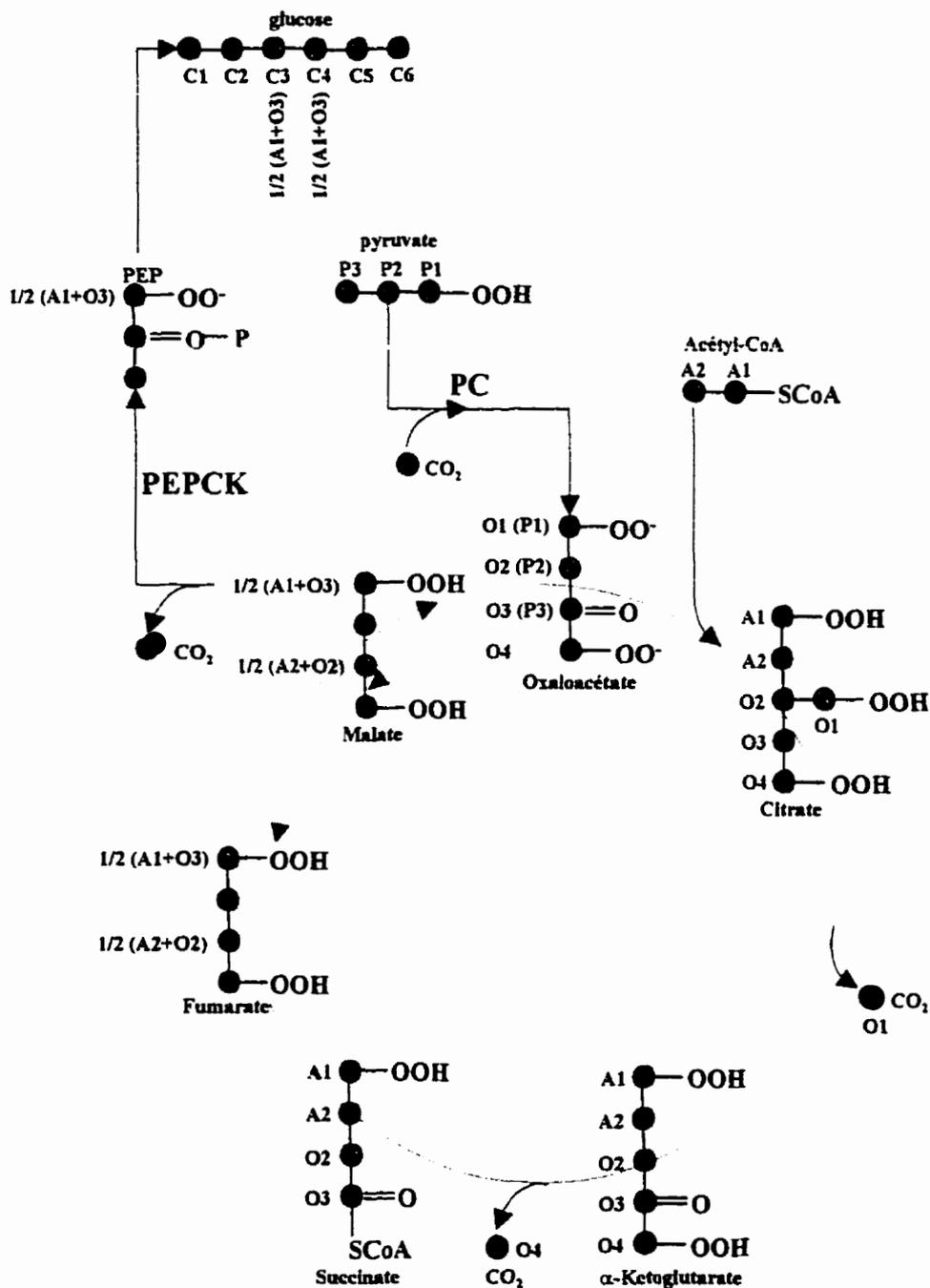


Figure 5: Distribution des carbones du $[\text{U}-^{14}\text{C}_3]$ -pyruvate dans les intermédiaires de la voie néoglucogénique et du cycle de l'acide citrique. À chaque tour du CAC, les atomes de ^{14}C issus du pyruvate (rouge) sont perdus par décarboxylation et remplacés par des atomes de ^{12}C issus de l'acétyl-CoA, qui provient principalement de l'oxydation des acides-gras (noir). Les atomes de ^{14}C du pyruvate sont également dilués par l'incorporation, par la PC, d'atomes de $^{12}\text{CO}_2$ (vert). Globalement, l'activité spécifique du glucose et du PEP est donc moindre que celle du précurseur marqué infusé (pyruvate, lactate ou alanine).

l'entraînement en endurance sur la contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose au repos et durant l'exercice prolongé.

Il faut noter que le carbone du CO₂ ne contribue pas de façon nette à la néoglucogénèse. Par contre, étant donné qu'il est incorporé dans l'oxaloacétate par la pyruvate carboxylase (PC), il se retrouve incorporé dans le glucose (Figure 6). Son entrée étant directement proportionnelle au flux de synthèse du PEP à partir du pyruvate, il est possible d'estimer la contribution fractionnelle de la néoglucogénèse en comparant l'enrichissement isotopique du bicarbonate et du glucose dans le sang artériel. L'équation utilisée est donc relativement similaire à celle qui est utilisée lors d'une infusion de précurseurs néoglucogéniques marqués (Equation 1 section 2.1.3) [Coggan et al., 1995; Ryan et al., 1993]:

Équation 2:

$$\mu\text{mole de PEP incorporé / min} = \text{EI glucose (\%)} / \text{EI CO}_2 \text{ expiré (\%)} \times \text{Temps (min)}$$

Où l'enrichissement isotopique du CO₂ expiré est considéré comme représentatif de l'enrichissement du CO₂ intra-mitochondrial.

Cette technique présente deux avantages par rapport à la méthode standard d'infusion de précurseurs marqués. Le premier est que le NaH¹³CO₃ permet de mesurer la néoglucogénèse à partir de l'ensemble des précurseurs néoglucogéniques qui ont le PEP comme intermédiaire. Ceci élimine le problème relié aux échanges de carbones entre les différents pools de précurseurs néoglucogéniques, lorsque des précurseurs tel le ¹³C ou ¹⁴C-lactate ou alanine sont utilisés [Hetenyi et al., 1980]. Le second avantage est que, contrairement à la méthode d'infusion de précurseurs marqués, la quantité réelle d'isotopes qui pénètrent dans la voie néoglucogénique est mieux connue. En effet, le CO₂ n'est pas compartimenté dans les mitochondries hépatiques [Esenmo et al., 1992]. De plus, avec les doses de traceur utilisées, il n'y a pas d'effet isotopique entre les bicarbonates circulants et le CO₂ expiré [Panteleev et al., 1999], si bien que l'enrichissement isotopique du CO₂ expiré à la bouche reflète bien l'enrichissement isotopique du CO₂ mitochondrial [Esenmo et al., 1992].

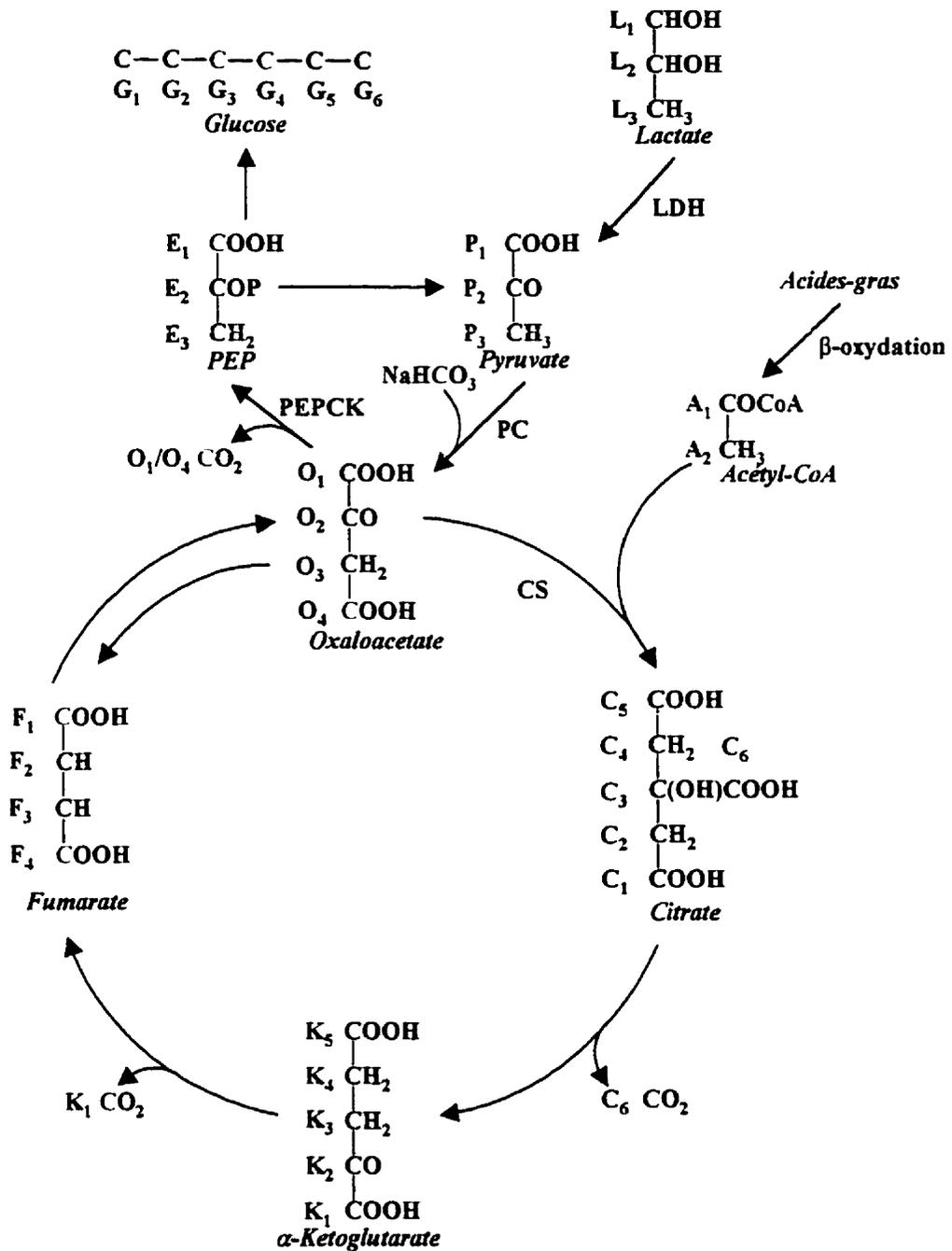


Figure 6: Incorporation d'isotopes dans le glucose lors d'une infusion de bicarbonates marqués. La fixation de CO₂ par la PC est une étape obligatoire dans la néoglucogénèse à partir de l'ensemble des précurseurs qui font leur entrée dans la voie au niveau du pyruvate. Le carbone marqué du NaHCO₃ (rouge) se retrouve en position O₄ de l'oxaloacétate, E₁ du PEP et G₃, G₄ du glucose. Parce que l'oxaloacétate et le fumarate sont des molécules symétriques et que la fumarase fonctionne à l'équilibre, des carbones marqués issus du NaHCO₃ sont également incorporés en position F₁ et O₁ du fumarate et de l'oxaloacétate.

Par contre, cette méthode présente deux inconvénients majeurs. Le premier est que la néoglucogénèse à partir du glycérol est incluse dans le flux de la glycogénolyse [Radziuk, 1982]. Le second inconvénient qui est le plus important, est que cette technique n'échappe pas au problème de sous-estimation du flux néoglucogénique dû aux échanges isotopiques dans le CAC [Coggan et al, 1995; Esenmo et al., 1992; Ryan et al., 1993]. En effet, l'enrichissement isotopique du PEP et donc du glucose dépend 1) du degré d'équilibration isotopique entre le fumarate et l'oxaloacétate, 2) du flux du CAC (flux de la citrate synthase) par rapport au flux d'oxaloacétate en PEP et 3) du recyclage isotopique par le cycle futile entre le PEP et le pyruvate (Figure 7).

.2.2 Quantification de l'échange isotopique et modélisation de la néoglucogénèse et du cycle de l'acide citrique.

.2.2.1 Modèle de Weinman et al.

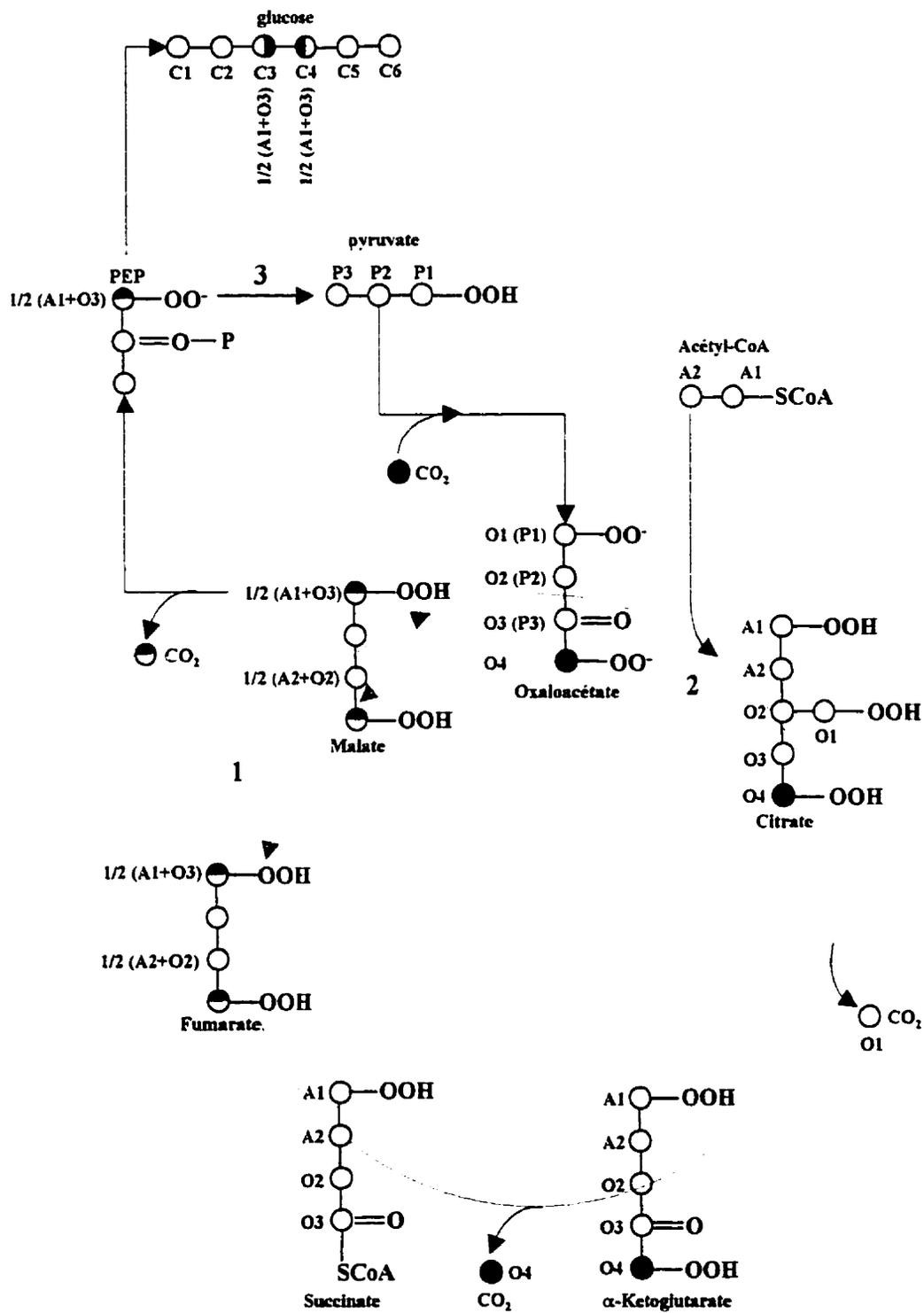
Dans les années 1950, Strisower, Chaikoff et Weinman ont étudié la distribution du ^{14}C de l'acétate dans le glucose et le CO_2 , sur des tranches de foie de rats incubées [Katz et Chaikoff, 1955; Strisower et al., 1952; Weinman et al., 1957]. Ces auteurs ont développé un modèle relativement simple de la néoglucogénèse et du CAC (Figure 8) comportant seulement deux variables; un influx d'acétate marqué qui correspond au flux du CAC (flux de la citrate synthase (CS)) et un influx de carbones non marqués, provenant d'une source autre que l'acétate et qui dilue le ^{14}C provenant de l'acétate. Weinman et al. [1957] ont défini le facteur y comme suit :

Équation 3:

$y = \text{Flux d'entrée de carbones non marqués dans le CAC} / \text{Flux d'entrée de carbones de l'acétate dans le CAC}$

Les sources de carbones non marqués sont: les carbones du pyruvate et des précurseurs qui entrent au niveau du pyruvate, le CO_2 issu de la carboxylation du pyruvate en oxaloacétate ainsi que les carbones provenant des acides aminés qui, par transamination forment des intermédiaires du CAC.

Figure 7 : Facteurs influençant l'enrichissement isotopique du PEP lorsque des bicarbonates marqués sont utilisés. Le carbone du $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ (ou $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$) (rouge) est incorporé en position O4 de l'oxaloacétate. En supposant un équilibrage rapide et complète de la réaction catalysée par la fumarase (flèches rouges : 1), des atomes de ^{13}C se retrouvent sur les carbones externes du fumarate, et du malate et sur les carbones internes du glucose. L'enrichissement isotopique théorique de ces atomes de carbone est donc égal à 50 % de l'enrichissement du NaHCO_3 . Cependant, leur enrichissement isotopique réel dépend également de la vitesse relative du CAC par rapport à la néoglucogenèse (2). Ceci est dû au fait qu'à chaque tour du CAC, des atomes de ^{12}C provenant de l'acétyl-CoA se retrouvent également sur les carbones externes du fumarate, et du malate et sur les carbones internes du glucose (A1). L'incorporation de ^{13}C dans le glucose dépend également de l'importance du recyclage isotopique par la PK (3). En effet, si le PEP marqué forme du pyruvate marqué en position P1, le ^{13}C est perdu par décarboxylation dans le CAC puisque le P1 du pyruvate devient le O1 de l'oxaloacétate.



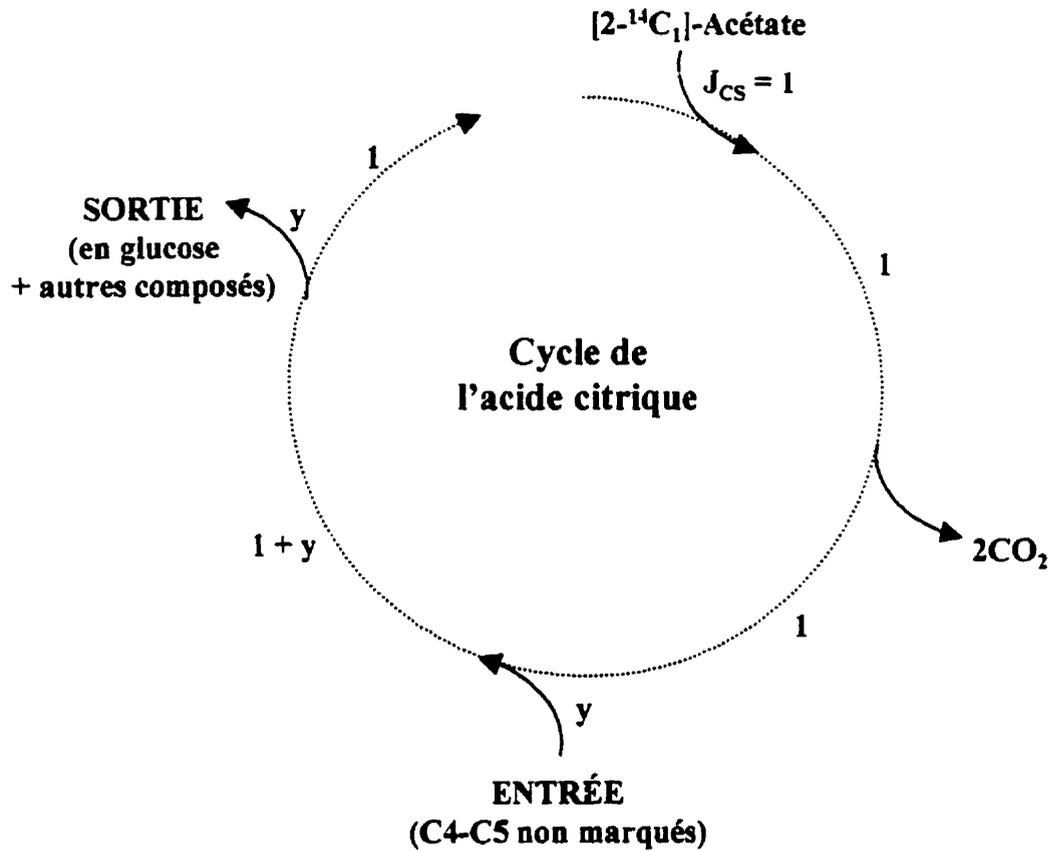


Figure 8: Modèle de la néoglucogénèse et du CAC proposé par Weinman et al. [1957]. Dans ce modèle, toute entrée de carbones dans le CAC provenant d'autres sources que l'acétate, est englobée en un seul terme défini comme « y ». La néoglucogénèse n'est possible que lorsque $y > 0$, c'est-à-dire lorsqu'il y a une entrée et une sortie nette de carbone du CAC.

La figure 9 montre comment le ^{14}C se distribue dans les intermédiaires du CAC, dans le PEP ainsi que dans le glucose, lorsque du $[2\text{-}^{14}\text{C}_1]\text{-acétate}$ est utilisé et que le CAC fonctionne en « circuit fermé », c'est à dire lorsqu'il n'y a pas d'entrée ni de sortie autre que celles de l'acétyl-CoA et du CO_2 . Le $[2\text{-}^{14}\text{C}_1]\text{-acétate}$ se condense avec l'oxaloacétate et donne du $[4\text{-}^{14}\text{C}_1]\text{-citrate}$. Le C4 du citrate devient le C2 du fumarate. Le fumarate étant une molécule symétrique, le C2 et le C3 sont équivalents et du $[2,3\text{-}^{14}\text{C}_2]\text{-oxaloacétate}$ est formé. Dans un second tour du CAC, la condensation de cette même molécule d'oxaloacétate avec une autre molécule de $[2\text{-}^{14}\text{C}_1]\text{-acétate}$ donne du $[2,3,4\text{-}^{14}\text{C}_3]\text{-citrate}$, et l'activité spécifique du C4 du citrate est deux fois plus élevée que celle du C2 et du C3. Si l'activité spécifique du C2 de l'acétyl-CoA est fixée à 100, la distribution de l'activité spécifique dans les carbones de l'oxaloacétate (numérotés de O1 à O4) après plusieurs tours du CAC, est donc la suivante: O1 = 50, O2 = 100, O3 = 100, O4 = 50 et le rapport O3/O1 est égal à 2.

À l'opposé, lorsqu'il y a de la néoglucogénèse à partir du pyruvate c'est à dire que le CAC fonctionne en « circuit ouvert », il y a une entrée de carbones sous forme d'oxaloacétate à partir du pyruvate ainsi que du CO_2 , qui viennent diluer l'activité spécifique des intermédiaires du CAC. Lors de sa carboxylation en oxaloacétate, le C1, le C2 et le C3 du pyruvate deviennent respectivement le C1, le C2 et le C3 de l'oxaloacétate, et le CO_2 devient le C4. Dans cette condition le rapport O3/O1 est toujours supérieur à 2, et ceci d'autant plus que le flux de carboxylation du pyruvate (γ) est important par rapport au flux du CAC. À partir de ces observations, Weinman et al. [1957] ont montré, lorsque du $[2\text{-}^{14}\text{C}_1]\text{-acétate}$ était utilisé comme traceur, que le facteur γ était relié au rapport de l'activité spécifique (AS) des carbones internes (O2 et O3) et externes (O1 et O4) de l'oxaloacétate par l'équation suivante:

Équation 4:
$$[\text{AS O2 ou O3} / \text{AS O1 ou O4}] = 2 + 2\gamma$$

Étant donné que le C3 de l'oxaloacétate devient le C1 et le C6 du glucose et que le C1 de l'oxaloacétate devient le C3 et le C4 du glucose (Figure 9), le terme de gauche dans l'équation 4 peut être remplacé par le rapport de l'activité spécifique des carbones externes (C1) et internes (C3) du glucose:

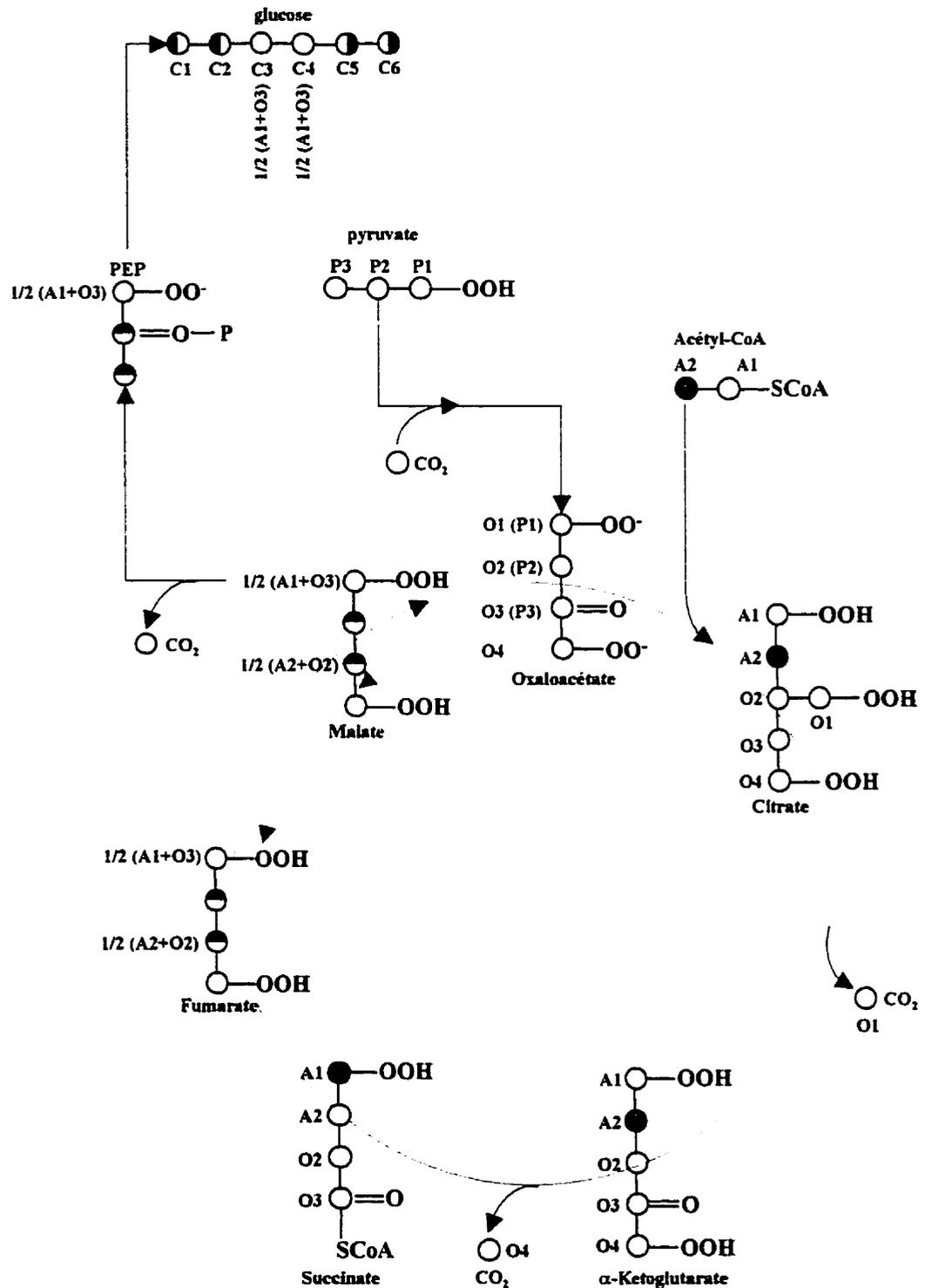


Figure 9: Distribution du ^{14}C dans les intermédiaires du CAC, dans le PEP et dans le glucose, lorsque du [2- $^{14}\text{C}_1$]-acétate est utilisé et que le CAC fonctionne en « circuit fermé ». Lorsque de l'acétate marqué en position A2 (rouge) est infusé de façon continue, le ^{14}C se retrouve principalement sur les carbones internes du malate et du fumarate ainsi que sur les carbones externes du glucose néoformé (C1, C2, C5 et C6).

Équation 5:
$$[\text{AS C1-Glucose} / \text{AS C3-Glucose}] = 2 + 2\gamma$$

Weinman et al. [1957] ont également déterminé l'équation permettant de connaître le pourcentage des carbones de l'oxaloacétate (Z) provenant de l'acétate lorsque du $[\text{U-}^{14}\text{C}_3]$ -acétate est utilisé:

Équation 6:
$$Z = 1 / (1 + 2\gamma)$$

.2.2.2 Facteur de correction de Hetenyi (H)

Hetenyi a déterminé un facteur de correction (H) pour la dilution isotopique dans le CAC [Hetenyi et Ferrarotto, 1983; Hetenyi, 1982; Hetenyi, 1979]. Hetenyi a proposé d'utiliser ce facteur pour la correction des flux néoglucogéniques mesurés *in vivo*, à partir de la méthode classique du rapport enrichissement du glucose / enrichissement du précurseur, lorsque des précurseurs néoglucogéniques marqués sont utilisés. Cette méthode nécessite deux expériences; la première avec du pyruvate marqué (issu du lactate ou de alanine) et la seconde avec du $[\text{2-}^{14}\text{C}_1]$ -acétate. Le $[\text{2-}^{14}\text{C}_1]$ -acétate est utilisé pour déterminer la valeur de γ à partir de l'équation 3. La valeur de γ a ensuite été utilisée pour déterminer Z à l'aide de l'équation 6. Puisque Z correspond à la fraction des carbones de l'oxaloacétate provenant de l'acétate, alors $1-Z$ correspond à la fraction des carbones provenant de sources autres que l'acétate. H a donc été défini par l'équation suivante:

Équation 7:
$$H = 1 / (1 - Z)$$

Un des désavantages de la méthode d'Hetenyi est qu'elle nécessite deux expériences distinctes. Il est alors possible que d'une expérience à l'autre le statut métabolique ne soit pas le même et introduise des erreurs de mesures.

.2.2.3 Méthode de Katz avec le $[\text{2-}^{14}\text{C}_1]$ -acétate ou le $[\text{3-}^{14}\text{C}_1]$ -pyruvate

Katz [1985] a suggéré une méthode utilisant le $[\text{2-}^{14}\text{C}_1]$ -acétate et le modèle de Weinman et al. [1957]. Cette approche permet de calculer directement la néoglucogénèse à partir du PEP en une seule expérience, à l'aide de l'activité spécifique

du glucose et du β -hydroxybutyrate ainsi que du rapport C1 /C3 du glucose plasmatique. Le laboratoire de Consoli et Gerich a utilisé cette technique pour calculer le facteur de correction pour la dilution isotopique dans le CAC et, déterminer la contribution de la néoglucogénèse à partir du PEP à la production hépatique de glucose chez l'Homme sain [Consoli et al., 1993; Consoli et al., 1987] et diabétique [Consoli et al., 1989].

L'usage de l'équation 5 permet de déterminer la valeur de y à partir du rapport de l'activité spécifique du C1 et du C3 du glucose plasmatique. Katz [1985] a montré que le rapport entre l'activité spécifique du PEP et de l'acétyl-CoA hépatique (P) était relié à y par l'équation suivante:

Équation 8:
$$P = [2 / 3 (5 + 4y)] / [2 (1 + y) (1 + 2y)]$$

Étant donné que le β -hydroxybutyrate est une molécule stable et que sa synthèse a lieu presque exclusivement dans le foie, Katz [1985] a proposé que l'activité spécifique du β -hydroxybutyrate plasmatique serait équivalente à l'activité spécifique du pool mitochondrial d'acétyl-CoA hépatique. À l'aide de cette information, l'activité spécifique théorique du PEP hépatique peut être déterminée ainsi:

Équation 9:
$$AS\ PEP = P \times AS\ \beta\text{-hydroxybutyrate}$$

Finalement, La contribution de la néoglucogénèse (% GNG) à partir du PEP à la production hépatique de glucose est obtenue à l'aide du rapport suivant:

Équation 10:
$$\% \text{ GNG} = AS\ \text{Glucose} / AS\ \text{PEP}$$

Il faut noter par ailleurs que l'équation 8 a également été utilisée avec le $[3\text{-}^{14}\text{C}_1]$ -lactate ou alanine pour déterminer la valeur de y ainsi que la contribution corrigée de ces précurseurs à la production de glucose [Bougnères et al., 1995; Consoli et al., 1993; Consoli et al., 1990; Consoli et al., 1990a], étant donné que le C2 de l'acétate et le C3 du pyruvate marquent les mêmes carbones de l'oxaloacétate (Figure 9).

2.2.4 Limitations à l'usage de [2-¹⁴C₁]-acétate *in vivo* et insuffisances du modèle de Weinman et al.

Le premier problème avec les méthodes proposées par Hetenyi [Hetenyi, 1979; Hetenyi, 1982] et par Katz [1985] est relié au métabolisme du [2-¹⁴C₁]-acétate *in vivo*. En effet, bien que l'usage de ce traceur sur le foie isolé perfusé donne des résultats satisfaisants, il a été démontré qu'il ne pouvait pas être utilisé *in vivo* à cause de son métabolisme dans les tissus extra hépatiques [Rognstad, 1988; Schumann et al., 1991]. En effet, Schumann et al. [1991] ont montré que le ¹⁴CO₂ produit par le métabolisme musculaire du [2-¹⁴C₁]-acétate se mélangeait au pool de bicarbonates et était probablement capté par le foie. Du ¹⁴CO₂ était ensuite incorporé dans l'oxaloacétate via la PC et éventuellement sur le C3 et le C4 du glucose. Étant donné que le facteur γ est déterminé à partir du rapport C1 sur C3 du glucose, cette incorporation de ¹⁴CO₂ sous-estime la valeur de γ . Sans parler du métabolisme extra hépatique du [2-¹⁴C₁]-acétate, la méthode de Hetenyi [Hetenyi, 1982; Hetenyi, 1979] et de Katz [1985] néglige l'effet de réincorporer du ¹⁴CO₂ produit par le CAC directement au niveau du foie. Magnusson et al. [1992] ont montré que l'erreur introduite par la ré incorporation de ¹⁴CO₂ était de 30 % chez des sujets à jeun de 60 h et probablement plus élevée (mais variable) chez des sujets nourris.

Le deuxième problème concerne le modèle de la néoglucogénèse et du CAC de Weinman et al. [1957]. Ce modèle suppose que le PEP issu de l'oxaloacétate n'est pas recyclé en pyruvate par la pyruvate kinase (PK) et que le pyruvate n'est pas décarboxylé en acétyl-CoA par la pyruvate deshydrogénase (PDH). Or, ces flux ne sont pas nuls, varient en fonction des conditions métaboliques et influencent le patron de marquage du glucose [Kelleher et Masterson, 1992; Landau et al., 1995; Magnusson et al., 1991]. Sur des foies isolés perfusés et des hépatocytes de rats à jeun incubés, le flux de carboxylation du pyruvate par la PC est de 2 à 4 fois plus grand que le flux de décarboxylation par la PDH [Exton and Park, 1967; Grunnet and Katz, 1978] et l'ajout d'oléate aux incubations d'hépatocytes inhibe complètement la PDH [Grunnet and Katz, 1978]. Cependant, Cohen [1983] a montré que l'activité de la PDH était plus grande à l'état nourri qu'à l'état de jeûne chez le Rat. *In vivo* chez l'Homme à jeun de 60 heures,

le rapport JPC/JPDH est de 25 [Magnusson et al., 1991]. Et ce rapport diminue à environ 12 chez des sujets à jeun depuis 12 à 14 heures [Diraison et al., 1998] et entre 3 et 6 à l'état nourri [Magnusson et al., 1991].

En ce qui concerne le flux au travers de la PK, des études *in vitro* avec du [2-¹⁴C₁]-pyruvate ont montré qu'il est égal à 50 % du flux néoglucogénique à l'état de jeûne et entre 300 et 400 % du flux néoglucogénique à l'état nourri [Friedman et al., 1971; Rognstad et Katz, 1972]. Lorsque du lactate plutôt que du pyruvate est utilisé, le flux de la PK est de 2 à 3 fois inférieur au flux néoglucogénique, mais les différences entre l'état de jeûne et l'état nourri persistent [Rognstad et Katz, 1977].

Des données plus récentes obtenues *in vivo* chez l'Homme à l'aide de la biopsie chimique au phényl-acétate ont confirmé l'importance du flux de la PK par rapport au flux néoglucogénique [Diraison et al. 1998; Landau et al., 1995; Magnusson et al., 1991]. Dans l'ensemble, ces résultats montrent que le recyclage du pyruvate par la PK ainsi que le flux de décarboxylation du pyruvate par la PDH ne peuvent pas être négligés puisqu'ils affectent les patrons de marquage des intermédiaires du cycle de Krebs, du PEP et du glucose [Kelleher, 1986]. Les insuffisances du modèle de Weinman et al. [1957], combinées aux problèmes reliés à l'usage du [2-¹⁴C₁]-acétate *in vivo*, font en sorte que les flux néoglucogéniques rapportés dans la littérature à l'aide de cette méthode sont sous-estimés.

2.2.5 Biopsie chimique au phényl-acétate

Kelleher a suggéré que la seule façon de pouvoir déterminer les flux de la PC, de la PDH, de la PK et de la CS *in vivo* était de connaître la distribution des atomes marqués d'un des intermédiaires du cycle de Krebs hépatique [Kelleher, 1986; Kelleher, 1985]. Magnusson et al. [1991] ont pour la première fois introduit une méthode non-invasive permettant de mesurer de façon spécifique le patron de marquage du glutamate hépatique *in vivo* chez l'Homme lorsque du [3-¹⁴C₁]-lactate ou du [3-¹³C₁]-lactate est administré. La biopsie chimique au phényl-acétate a par la suite été utilisée chez l'Homme sain et diabétique [Diraison et al. 1998; Landau et al., 1995].

Cette technique est basée sur le fait que chez les primates, le phényl-acétate (un xénobiotique) se conjugue spécifiquement avec la glutamine pour former la phénylacétyl-glutamine (PAGN) avant son excrétion par voie urinaire [James et al., 1972]. Ainsi, l'hydrolyse *in vitro* de la PAGN urinaire donne de la glutamine et du phényl-acétate et permet de mesurer l'enrichissement isotopique de chacun des carbones de la glutamine. Étant donné qu'il n'y a pas de réarrangements de carbones entre l' α -cétoglutarate, le glutamate et la glutamine et que le métabolisme du phényl-acétate est exclusivement hépatique; l'enrichissement isotopique des carbones de la glutamine est représentatif de l'enrichissement du l' α -cétoglutarate hépatique [Didonato et al., 1993; Magnusson et al., 1991]

L'enrichissement isotopique des cinq carbones de la glutamine urinaire donne accès à plusieurs paramètres. Lorsque du [3- $^{13}\text{C}_1$]-lactate est utilisé, l'enrichissement en ^{13}C des C2 et C3 du glutamate hépatique soit K2 et K3 de l' α -cétoglutarate (Figure 10) est fonction du flux de la PC. L'enrichissement du C4 du glutamate est fonction du flux de la PDH, celui du C1 est fonction du flux de la CS et celui du C5 du recyclage du pyruvate par la PK. Les équations développées par Magnusson et al. [1991], basées sur le modèle du CAC et de la néoglucogénèse proposé par Katz [1985] permettent donc de déterminer plusieurs paramètres du cycle de Krebs ainsi que la dilution isotopique au niveau de l'OAA et la formation de glucose à partir du PEP (les flux V1 à V9 sur la Figure 10).

Deux postulats sont essentiels dans cette approche. Le premier est que le patron de marquage de la glutamine reflète celui de l' α -cétoglutarate hépatique. Le second postulat est que le marquage des intermédiaires du cycle de Krebs est homogène. Di Donato et al. [1993] ont confirmé que le premier postulat était valide en montrant sur des foies isolés de rats que le patron de marquage de la glutamine du glutamate et de l' α -cétoglutarate hépatique était similaire. La validité du second postulat a cependant été remise en question par DesRosiers et al. [1995], qui ont rapporté une hétérogénéité dans le marquage des intermédiaires du CAC sur des foies isolés perfusés de rats à jeun de 12 heures. Ces auteurs ont mesuré directement le patron de marquage du glucose, du PEP,

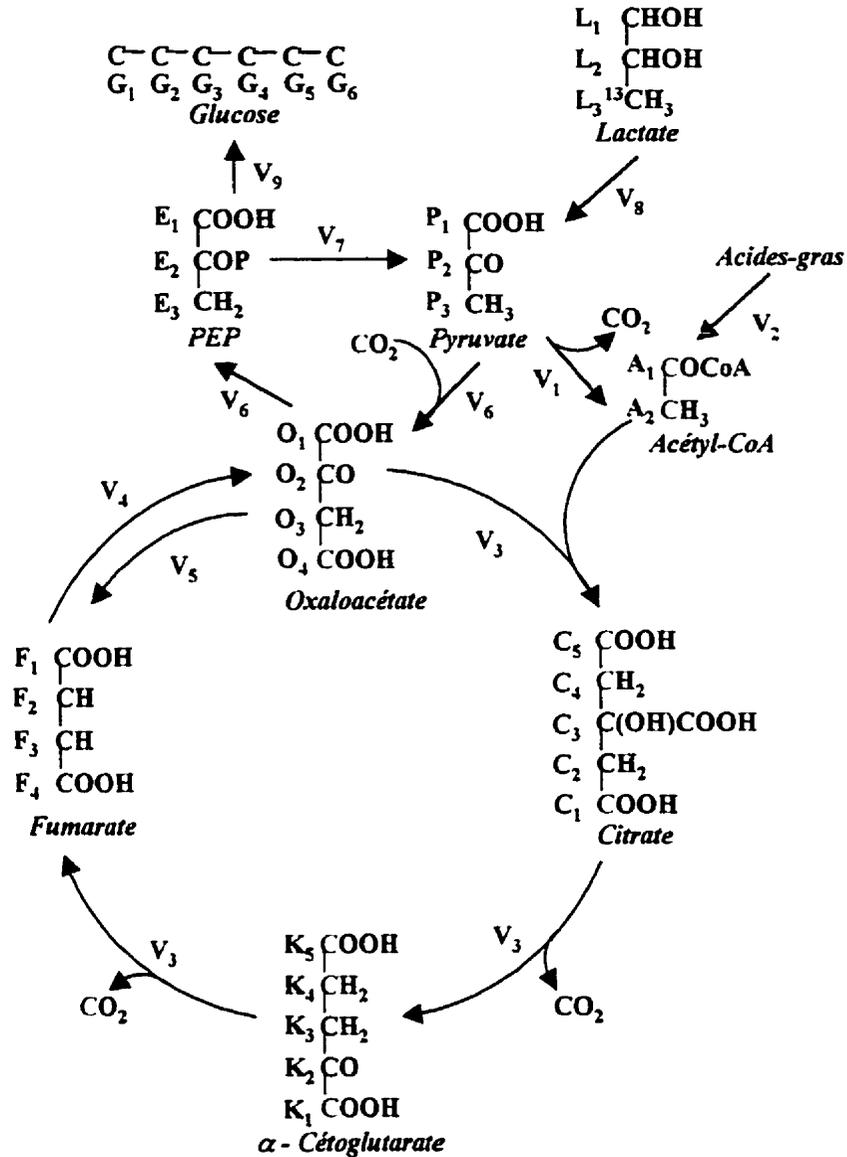


Figure 10: Modèle du CAC et de la néoglucogénèse proposé par Magnusson et al. [1992]. Ce modèle inclut notamment le flux de la CS (V_3), de la PC et de la PEPCK (V_6), de la PDH (V_1), et de la PK (V_7). Les carbones issus du pyruvate, du CO_2 et de l'acétyl-CoA sont identifiés par les couleurs noir, vert et rouge respectivement. L'analyse des isotopomères de position de l' α -cétoglutarate est effectuée à l'aide de la biopsie chimique au phényl-acétate. Les paramètres V_1 à V_9 sont calculés à partir de l'analyse des isotopomères de position de la phényl-acétyl-glutamine urinaire ainsi que du glucose et du lactate circulant. Chez l'Homme, les différents flux sont tous exprimés en terme relatif par rapport au flux de la CS (V_3) qui est fixé arbitrairement à 10. Cependant, si la valeur absolue d'un des flux est connu (ex: la prise de lactate hépatique), il est possible de déduire la valeur absolue de l'ensemble des autres flux.

du malate, de l'aspartate, du citrate, du glutamate et de la glutamine lorsque du [U-¹³C₃]-lactate-pyruvate était perfusé. Lorsque le patron de marquage du PEP et du citrate était utilisé pour calculer le facteur de dilution dans le CAC, les valeurs du flux néoglucogénique ainsi obtenues étaient en accord avec le flux néoglucogénique calculé à partir de la prise totale de lactate-pyruvate et la production de glucose (sur des foies de rats à jeun de 12 heures, la contribution de la néoglucogénèse était d'environ 100 %). Par contre, lorsque le patron de marquage du glutamate était utilisé pour calculer les paramètres du CAC et le facteur de dilution, le flux néoglucogénique obtenu était de 40 %. Ces auteurs ont montré que cette erreur était principalement attribuable au fait que le modèle de la néoglucogénèse de Katz [1985] utilisé par Magnusson et al. [1991] ne tenait pas compte du flux de la réaction inverse de l'isocitrate déshydrogénase et de la conversion du citrate en OAA par l'ATP-citrate lyase (Figure 11).

Néanmoins, la biopsie chimique au phényl-acétate permet probablement d'obtenir des résultats précis *in vivo* lorsque le flux au travers de l'ATP-citrate lyase est faible. Cette enzyme, qui est impliquée dans la voie de la lipogénèse, est inhibée en période de jeûne et active de façon maximale dans les premières heures suivant un repas. Il est donc possible que la biopsie chimique au phényl-acétate sous-estime la néoglucogénèse à partir du PEP en situation post prandiale immédiate. Cependant, cette sous-estimation serait mineure au cours du jeûne.

2.2.6 Infusion de [U-¹³C₆]-glucose

L'analyse de distribution d'isotopomères de masse lors d'infusion de [U-¹³C₆]-glucose a été en grande partie développée et utilisée par Katz et collaborateurs [Katz et Tayek, 1998; Katz et al., 1991; Katz et al., 1990; Katz et al. 1989; Tayek et Katz, 1997; Tayek et Katz, 1996]. Katz et al. [Katz et al., 1991; Katz et al., 1990; Katz et al. 1989] ont d'abord utilisé cette méthode pour déterminer la contribution de la voie directe et indirecte à la synthèse de glucose. Tayek et Katz [1996] ont ensuite publié un article dans lequel les équations développées pour l'étude du métabolisme du glycogène hépatique ont été adaptées pour mesurer la production hépatique de glucose, le recyclage du glucose par le cycle de Cori ainsi que le flux néoglucogénique chez des sujets

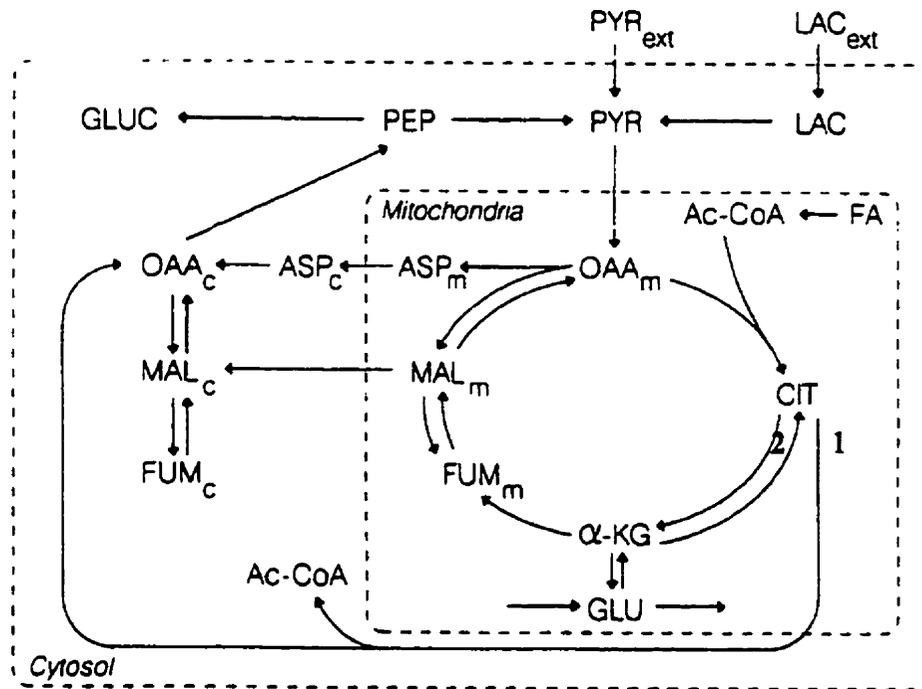


Figure 11: Modèle du CAC et de la néoglucogénèse proposé par Magnusson et al. [1992], tel que modifié par DesRosiers et al. [1995]. DesRosiers et al. [1995] ont utilisé un modèle de foie isolé perfusé avec du [U-¹³C₆]-glucose, du [U-¹³C₃]-lactate ou pyruvate. L'analyse de distribution d'isotopomères de masse de plusieurs intermédiaires du CAC, de la glutamine, du PEP et du glucose a été effectuée. Cette approche a permis de tester le modèle de Magnusson et al. [1992] (Figure 7). Les données ont montré que ce modèle était insuffisant pour expliquer les patrons de marquages des différents métabolites obtenus. Les auteurs ont montré que cela était principalement dû au fait que dans le modèle de Magnusson et al. [1992] le flux de la réaction de clivage du citrate (1) et de la réaction inverse de l'isocitrate déshydrogénase (2) n'étaient pas inclus. En effet, ces deux réactions étaient responsables des différences observées entre le patron de marquage réel du PEP et celui calculé à l'aide de la fraction PEP de la glutamine. Abréviations : FA: acides-gras; Ac-CoA: acétyl-CoA, CIT: citrate, α-KG: α-cétoglutarate, GLU: glutamine, FUM: fumarate, MAL: malate, OAA: oxaloacétate, ASP: aspartate, PYR: pyruvate, PEP: phosphoenol-pyruvate, GLUC: glucose. Les sigles *m* et *c* en indice font référence au compartiments mitochondrial et cytosolique respectivement.

normaux et diabétiques. À la suite de cet article original, deux autres études ont été publiées par Katz et Tayek [Katz et Tayek, 1998; Tayek et Katz, 1997] avec des modifications apportées aux équations. En 1998, le laboratoire de Landau [Landau et al., 1998] a publié un article mettant en évidence les limites à l'usage de cette méthode pour estimer la contribution de la néoglucogénèse. Cette étude a également revu de façon très critique les équations proposées par Tayek et Katz [Tayek et Katz, 1997; Tayek et Katz, 1996] qui, selon toute vraisemblance mènent à une grande surestimation de la contribution de la néoglucogénèse.

Le principe de base de cette méthode est relativement simple (Figure 12). Lorsque du glucose marqué en six positions ($[U-^{13}C_6]$ -glucose ou M6-glucose) est infusé de façon continue, deux moles de lactate (de pyruvate et d'alanine également) marquées en trois positions ($m3$ -lactate) sont formées pour chaque mole de M6-glucose métabolisée par les tissus. Ces molécules de $m3$ -lactate sont ensuite diluées par le lactate endogène non marqué ($m0$ -lactate) avant d'être recyclées en glucose au niveau du foie. Les isotopomères de masse du glucose engendrés par la néoglucogénèse sont presque exclusivement du M1, M2 et M3. En effet, les chances que deux molécules de $m1$, $m2$ ou $m3$ -lactate se combinent ensemble au cours de la synthèse de glucose et donnent du M4, M5 et M6-glucose sont très faibles, voire négligeables.

Puisque la néoglucogénèse ne produit pas de M6-glucose, l'enrichissement en M6-glucose du sang artériel est donc uniquement fonction de la vitesse d'infusion du $[U-^{13}C_6]$ -glucose et cette vitesse peut être utilisée pour calculer le taux d'apparition du glucose circulant (R_a) d'après l'équation suivante:

Équation 11: $R_a \text{ Glucose} = V (M6 \text{ du } [U-^{13}C_6]\text{-Glucose infusé}) / M6 \text{ du glucose artériel}$

Où V est la vitesse d'infusion du $[U-^{13}C_6]$ -glucose, et $M6$ est l'enrichissement molaire des molécules de glucose dans le sang artériel qui sont marquées en six positions.

Il est également possible de calculer le facteur de dilution (D) des molécules de lactate marquées par le lactate non marqué à l'aide de l'équation suivante:

Équation 12: $D = 0,5 \cdot (M1 + M2 + M3) + M6 / m1 + m2 + m3$

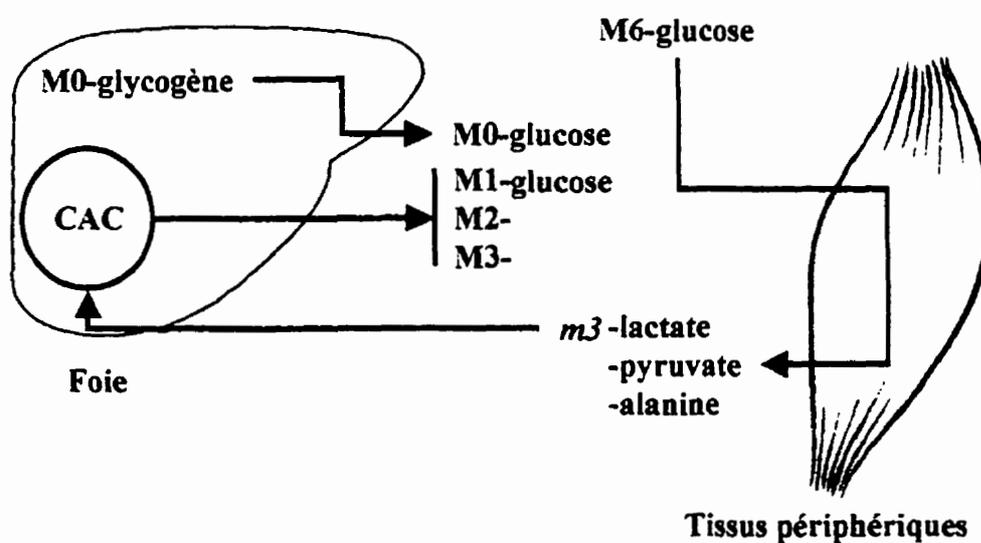


Figure 12: Distribution d'isotopomères de masses du glucose lors d'une infusion continue de $[U-^{13}C_6]$ -glucose. Les lettres M et m font référence aux isotopomères de masse du glucose/glycogène et des précurseurs glucoformateurs formés à partir du $[U-^{13}C_6]$ -glucose. Les chiffres 0 à 6 font référence au nombre de d'atomes de ^{13}C présent sur la molécule, indépendamment de leur position spécifique.

Où M1, M2, M3 et M6 et m1, m2 et m3 sont les enrichissement des différents isotopomères de masse du glucose et du lactate artériel respectivement. Le facteur 0,5 est utilisé parce que la moitié des unités trioses qui forment les isotopomères de masse M1, M2 et M3-glucose ne provient pas du [U-¹³C₆]-glucose mais de carbones endogènes.

La fraction (F) des molécules de glucose qui ont été recyclées par le cycle de Cori est calculée à l'aide de l'équation suivante:

Équation 13:
$$F = 0,5 \cdot (M1 + M2 + M3) / 0,5 \cdot (M1 + M2 + M3) + M6$$

Finalement, la néoglucogénèse peut être calculée, à partir des précurseurs entrant au niveau du pyruvate, en tenant compte du recyclage du glucose par le cycle de Cori et de la dilution du lactate marqué par le lactate endogène non marqué:

Équation 14:
$$GNG (\%) = R_a \times D \times F$$

L'ensemble des équations présentées ci-dessus sont celles de Landau et al. [1998] qui ont revu et corrigé les équations proposées par Tayek et Katz [Katz et Tayek, 1998; Tayek et Katz, 1997; Tayek et Katz, 1996]. En effet, Landau et al. [1998] ont montré que les équations utilisées par le groupe de Katz menaient à une grande surestimation de la contribution réelle de la néoglucogénèse mesurée à l'aide de l'analyse de distribution des isotopomères de masse lors d'une infusion de [U-¹³C₆]-glucose (de l'ordre de 60 à 86 %). Sans entrer dans les détails, Tayek et Katz [Tayek et Katz, 1997; Tayek et Katz, 1996] avaient mal différencié la dilution et les échanges isotopiques dans leurs équations. De plus, le facteur 0,5 utilisé dans les équations 12 et 13 de Landau et al. [1998] était négligé. Finalement, Tayek et Katz avaient introduit un facteur de correction inutile dans ce contexte qui visait à corriger pour la dilution isotopique du pyruvate dans le cycle de Krebs.

En utilisant les équations présentées ci-dessus, Landau et al. [1998] ont calculé des contributions anormalement basses de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose chez des sujets à jeun de 64 heures (entre 23 et 40 %). Chez ces mêmes

sujets, la contribution de la néoglucogénèse était de l'ordre de 43 à 63 % lorsque calculée à l'aide des équations de Tayek et Katz [1997]. Deux conclusions ont été émises par Landau et al. [1998]. La première est que les valeurs plausibles rapportées par Tayek et Katz [1996; 1997] et Katz et Tayek [1998] pour la contribution de la néoglucogénèse étaient le fruit d'une erreur fortuite. La seconde conclusion est que, malgré l'utilisation d'équation correctes, l'analyse de distribution d'isotopomères de masse lors d'une infusion de [U-¹³C₆]-glucose sous-estime de façon importante la contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose.

Plusieurs raisons peuvent expliquer pourquoi l'analyse de distribution des isotopomères de masse du glucose lors d'une infusion de [U-¹³C₆]-glucose sous-estime la contribution de la néoglucogénèse:

- 1) La contribution du glycérol à la production hépatique de glucose est considérée dans la contribution de la glycogénolyse;
- 2) La conversion en glucose d'acides aminés n'ayant pas comme intermédiaire le pyruvate n'est pas comptabilisée (exemple: aspartate, glutamate, glutamine);
- 3) L'oxaloacétate et l' α -cétoglutarate marqués échangent avec l'aspartate, le glutamate et la glutamine plasmatique non marqués ce qui crée une dilution isotopique;
- 4) Finalement, il est possible que la distribution des isotopomères de masse du lactate artériel ne soit pas la même que celle du pyruvate intra-hépatique et intra-rénal.

.2.3 Méthodes isotopiques ne nécessitant pas de modèle de correction pour les échanges et la dilution isotopique dans le cycle de Krebs

.2.3.1 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du ¹³C-glycogène (¹³C-RMN) couplée à l'imagerie de résonance magnétique (IRM)

La méthode non-invasive de quantification de la glycogénolyse hépatique et de la néoglucogénèse chez l'humain avec la ¹³C-RMN et l'IRM a été développée par Rothman et Shulman [Rothman et al., 1991] qui ont mesuré la contribution de la

glycogénolyse et la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose au cours d'un jeûne de 64 heures chez des sujets sains. Depuis, cette technique a été utilisée pour l'étude des flux glycogénolytique et néoglucogénique chez des sujets sains [Petersen et al., 1999; Petersen et al., 1998; Petersen et al., 1996] et cirrhotiques [Petersen et al., 1999] durant les premières heures post prandiales (entre 5 et 19 h après l'ingestion du dernier repas), ainsi que chez des sujets diabétiques non insulino-dépendants (DNID) à jeun de 24 h [Magnusson et al., 1992]. Hwang et al. [1995] s'en sont également servi pour l'étude de la glycogénèse hépatique par la voie directe et indirecte à la suite d'un repas mixte chez le sujet sain et DNID.

Au cours d'une période d'observation, la mesure de la glycogénolyse nécessite tout d'abord des mesures du spectre C1 du glycogène par ^{13}C -RMN (mesure du contenu en glycogène en mmoles) au début et à la fin de la période [Petersen et al., 1999] ou à intervalles réguliers durant la période d'observation [Hwang et al., 1995; Magnusson et al., 1992; Petersen et al., 1996; Rothman et al., 1991]. Ces mesures sont ensuite couplées à celle du volume hépatique (en L) mesuré par IRM pour obtenir la concentration hépatique de glycogène (en mmoles/L). Le flux glycogénolytique calculé par différence entre la concentration de glycogène initiale et finale représente donc une valeur moyenne sur l'ensemble de la période d'observation. La contribution de la néoglucogénèse est, quant à elle, déterminée par différence entre la production hépatique de glucose, mesurée avec du $[6,6\text{-}^2\text{H}]$ -glucose dans les dernières heures de la période d'observation, et le flux glycogénolytique moyen.

L'exactitude de cette méthode repose en grande partie sur, la précision, et la reproductibilité des mesures par ^{13}C -RMN et IRM. En effet, toute erreur faite sur la mesure du flux glycogénolytique se répercute sur le flux néoglucogénique mesuré par différence. En ce qui a trait à la mesure du volume hépatique par IRM, Petersen et al. [1996] ont rapporté qu'elle était précise et reproductible. En effet, dans cette étude [Petersen et al., 1996], l'erreur sur la mesure d'un volume prédéterminé, utilisé comme volume étalon, était de $\pm 5\%$, avec un coefficient de variation de $\pm 1\%$. Les études qui ont utilisé cette technique, le volume du foie a été mesuré au début et à la fin de la

période d'observation, de façon à éviter une sous-estimation de la glycogénolyse due à la diminution du volume hépatique au cours du jeûne. En effet, Rothman et al. [1991] ont rapporté que le volume du foie diminuait de 26 % lors d'un jeûne de 64 h, probablement à cause de la perte d'eau associée au glycogène ainsi qu'à la protéolyse hépatique.

En ce qui a trait à la mesure du contenu en glycogène par ^{13}C -RMN, sa validité repose sur l'hypothèse que tout le glycogène est visible par ^{13}C -RMN et, que le signal RMN est proportionnel à la quantité d'unités glycosyls. Des données obtenues *in vitro* [Shalwitz et al., 1987; Sillerud et Shulman, 1983] et *in vivo* [Gruetter et al., 1991; Taylor et al., 1992] montrent que la visibilité du glycogène en RMN est probablement de 100 %. En effet, sur du glycogène extrait ou sur du tissu hépatique, il a été montré que le signal RMN était équivalent à la somme des unités glycosyls mesurées par méthode biochimique standard [Shalwitz et al., 1987; Sillerud et Shulman, 1983]. De plus, des données obtenues *in vivo* chez le Lapin [Gruetter et al., 1991] et chez l'Homme [Taylor et al., 1992] ont montré que la concentration de glycogène musculaire, mesurée *in vivo* par ^{13}C -RMN, était similaire à celle obtenue par dosage biochimique standard sur des échantillons prélevés par biopsie à l'aiguille. Quant à la précision et la reproductibilité de la mesure du contenu en glycogène par ^{13}C -RMN, Rothman et al. [1991] ont montré que le coefficient de variation lors de mesures répétées était seulement de 7 % et que, l'écart type sur la mesure du contenu en glycogène provoqué par le bruit de fond spectral était de ± 5 %.

Outre la fiabilité de la technique de mesure du flux glycogénolytique elle-même, d'autres éléments sont à considérer pour une appréciation critique des flux néoglucogéniques déterminés avec cette approche. Le premier est que la ^{13}C -RMN et l'IRM mesurent la glycogénolyse hépatique, que le $[6,6\text{-}^2\text{H}]$ -glucose mesure la production systémique de glucose qui comprend non seulement la contribution du foie mais aussi celle des reins. Si la production rénale de glucose est significative, la contribution réelle de la néoglucogénèse hépatique est donc surestimée. Cette surestimation est probablement mineure en situation post prandiale immédiate mais, peut

devenir importante au cours du jeûne prolongé où les reins contribuent de façon plus importante à la production systémique de glucose (10 % après 60 h de jeûne) [Postle and Bloxham, 1980]. Le second élément à considérer est que la mesure de la production hépatique de glucose à l'aide du [6,6-²H]-glucose est souvent effectuée plusieurs heures après l'acquisition des spectres de ¹³C-RMN, car les prélèvements sanguins sont impossibles lorsque les sujets sont à l'intérieur de l'aimant. À titre d'exemple, dans l'étude de Magnusson et al. [1992], le flux glycolytique moyen a été mesuré sur une période de 20 heures et la mesure de la production hépatique de glucose a été effectuée pendant les trois dernières heures. Si au cours de la période d'observation, la production hépatique de glucose change de façon significative, la mesure du flux néoglucogénique sera sur ou sous-estimée [Petersen et al., 1999]. Dans l'ensemble, ces petits détails expliquent probablement pourquoi la contribution de la néoglucogénèse mesurée à l'aide de cette méthode est assez variable. Par exemple, dans l'étude de Petersen et al. [1996] la contribution moyenne de la néoglucogénèse entre la 4^{ème} et la 12^{ème} heure post prandiale était d'environ 50 % chez les 13 sujets étudiés, cependant les valeurs minimales et maximales observées étaient de 24 et 90 % respectivement. De plus, si on compare ces résultats avec ceux de Rothman et al. [1991] qui ont trouvé que pendant les 22 premières heures de jeûne la contribution de la néoglucogénèse était en moyenne de 64 %, il aurait fallu, en tenant compte des résultats de Petersen et al. [1996] que la contribution de la néoglucogénèse entre la 12^{ème} et la 22^{ème} heure de jeûne soit d'environ 80 %, ce qui est trop élevé par rapport à la plupart des estimations obtenues à l'aide d'autres méthodes [Chandramouli et al., 1997].

Globalement et malgré ces imperfections, la méthode proposée par Rothman et Shulman [Rothman et al., 1991] qui met à profit la puissance de la ¹³C-RMN combinée à l'IRM est actuellement considérée, avec la méthode de l'²H₂O proposée par Landau [Landau et al., 1996; Landau et al., 1995b], comme une des plus fiables pour la mesure de la néoglucogénèse. Elle permet la mesure du flux néoglucogénique réel à partir de l'ensemble des précurseurs glucoformateurs. Enfin, elle repose sur des mesures directes avec un minimum de transformations mathématiques issues d'un modèle et d'hypothèses complexes reliés à la dilution et aux échanges isotopiques dans le CAC.

2.3.2 Méthode de l'²H₂O

La méthode de mesure non invasive de la contribution de la néoglucogénèse à la production systémique de glucose à l'aide de l'²H₂O chez l'Homme a été mise au point et utilisée par le laboratoire de Landau [Chandramouli et al. 1997; Kalhan et al., 1997; Landau et al. 1996; Landau et al., 1995b; Petersen et al., 1999]. Auparavant, les principes de cette méthode ont été en grande partie détaillés sur un modèle animal [Guo et al., 1992; Kuwajima et al., 1986; Okajima et al., 1981; Postle et Bloxham, 1980; Rognstad, 1991; Rognstad et al., 1974; Shalwitz et al., 1994]. Son utilisation chez l'Homme était cependant restreinte par la nécessité d'utiliser des doses importantes de ³H₂O ou de ²H₂O pour avoir une mesure précise. Landau et al. [1996; 1995b] ont donc développé une méthode de dosage permettant d'abaisser la quantité de ²H₂O à des niveaux acceptables pour une utilisation sans risques et effets secondaires chez l'Homme. Cette méthode a été utilisée pour mesurer la contribution de la néoglucogénèse au cours du jeûne de durée croissante chez le sujet normal [Chandramouli et al. 1997; Landau et al., 1996; Landau et al. 1995b]. Elle a également été utilisée pour la mesure de la néoglucogénèse au cours de la gestation chez la femme saine [Kalhan et al., 1997]. Récemment, les laboratoires de Shulman et Landau se sont associés pour mesurer la contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose chez des sujets sains et cirrhotiques à l'aide des méthodes développées par les deux laboratoires: la ¹³C-RMN combinée à l'IRM et l'²H₂O [Petersen et al., 1999].

Cette technique est basée sur le principe que dans plusieurs réactions de la néoglucogénèse et dans une réaction de la glycolyse, il y a des échanges entre les protons de l'eau corporelle et ceux qui sont présents sur les squelettes carbonés de différents métabolites intermédiaires, ce qui résulte en une incorporation de deutérium sur les carbones du glucose. Les étapes enzymatiques de la néoglucogénèse dans lesquelles il y a des échanges de protons sont celles de 1) l'hydratation du fumarate en malate par la fumarase, 2) l'hydratation du phosphoenol-pyruvate en 2-phosphoglycérate (2-PG) par l'énolase et 3) l'isomérisation du dihydroxyacétone-phosphate (DHAP) et du glycéraldéhyde-3P (GAP) par la triose-phosphate isomérase. Comme le montre la figure 13, la réaction 1 de la néoglucogénèse marque en définitive les hydrogènes du C6 du

glucose (via le C3 du pyruvate), alors que les réactions 3 et 4 marquent ceux du C5 (via le C2 du 2-PG et le C2 du GAP). Les hydrogènes du C6 du glucose peuvent aussi être marqués à cause de l'activité réversible des transaminases hépatiques et des échanges entre les protons du lactate et ceux de l'eau corporelle [Kuwajima et al., 1986; Rognstad et Wals, 1976]. En ce qui a trait à la voie de la glycogénolyse, les seuls échanges de protons ont lieu dans la réaction d'isomérisation entre le glucose-6P (G-6P) et le fructose-6P (F-6P) catalysée par la phosphoglucose isomérase. Dans cette réaction à l'équilibre il y a un échange rapide et complet entre l'hydrogène sur le C2 du G-6P issu du glycogène et les protons de l'eau. Cependant, il est à noter que le glucose issu de la néoglucogénèse se retrouve également marqué en position C2 à cause de cette rapide isomérisation.

Lorsque de l' $^2\text{H}_2\text{O}$ est administrée et qu'un état stable d'enrichissement est atteint, le rapport de l'enrichissement en deutérium du C6 du glucose et de l'eau corporelle (APE C6 / APE H_2O urinaire) est une mesure directe de la néoglucogénèse à partir du PEP [Kalhan et al., 1997; Landau et al., 1995b]. Le rapport de l'enrichissement du C5 du glucose et de l'eau corporelle est une mesure de la néoglucogénèse totale (PEP + glycérol) [Kalhan et al., 1997; Landau et al., 1996] et celui du C2 et de l'eau corporelle est une mesure de la production totale de glucose [Landau et al., 1996; Landau et al., 1995b]. Une deuxième façon d'obtenir la contribution fractionnelle de la néoglucogénèse est de mesurer, le rapport C5/C2 et C6/C2 de l'enrichissement en ^2H du glucose. Le rapport C5/C2 représente la contribution fractionnelle de la néoglucogénèse à partir de l'ensemble des précurseurs glucoformateurs (glycérol inclus) [Chandramouli et al., 1997; Landau et al., 1996], alors que le rapport C6/C2 représente la contribution fractionnelle de la néoglucogénèse à partir du PEP (glycérol exclu) [Kuwajima et al., 1986; Landau et al., 1995b]. L'avantage de la seconde façon par rapport à la première est que l'atteinte d'un état stable d'enrichissement n'est pas nécessaire

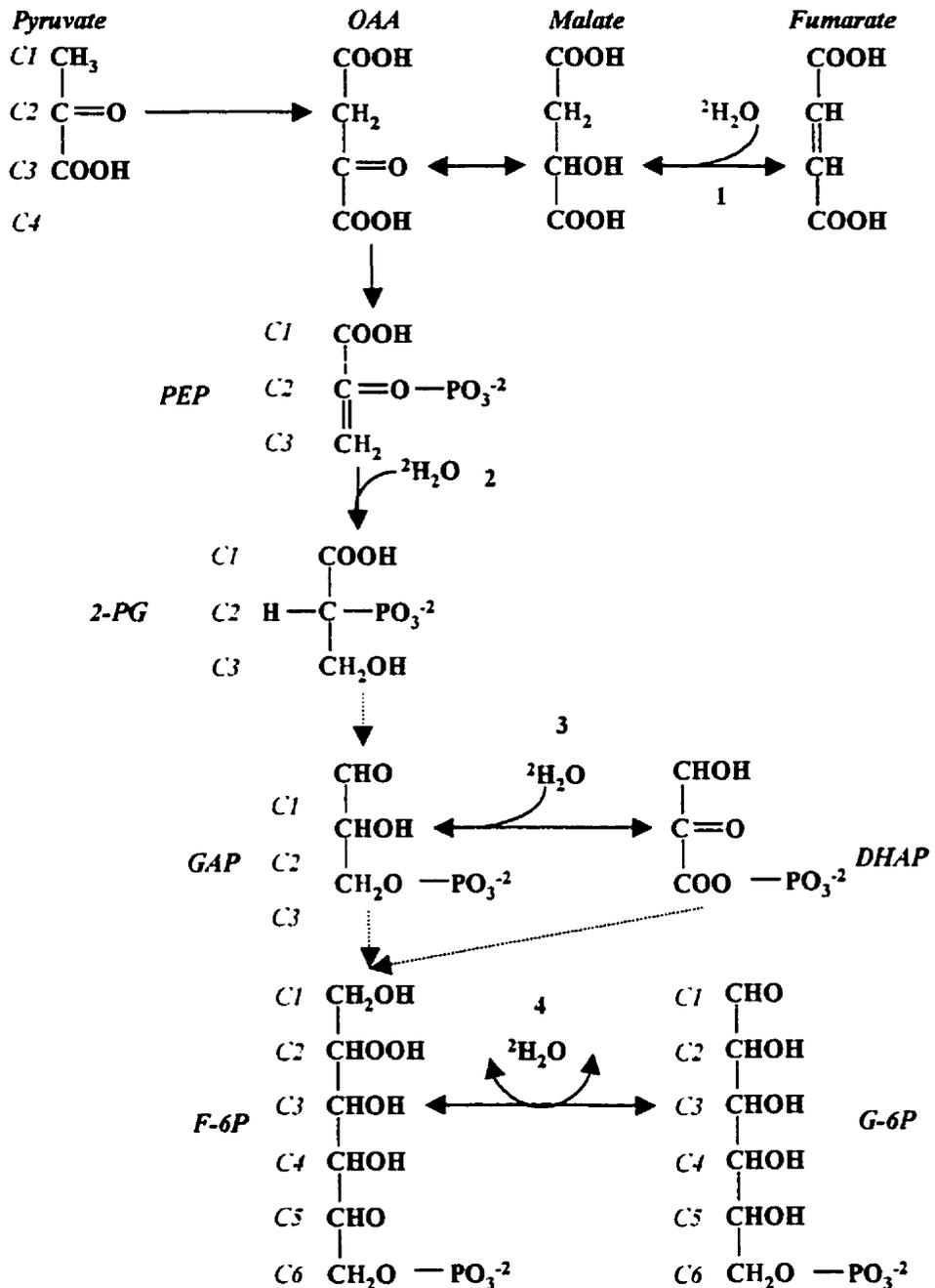


Figure 13 : Incorporation de deutérium sur les carbones du glucose à partir de l'²H₂O. Les carbones des différents intermédiaires de la néoglucogenèse sont numérotés (C1 à C6 rouge) du côté gauche de la figure. Le ²H en position C6 (rouge) du glucose-6 phosphate (G-6P) est incorporé lors de l'hydratation du fumarate en malate par la fumarase (1). Le ²H en position C5 (vert) est incorporé lors de l'hydratation du phosphoenol-pyruvate (PEP) en 2-phosphoglycérate (2-PG) par l'énolase (2) et lors de l'isomérisation du dihydroxyacétone-phosphate (DHAP) et du glycéraldéhyde-3P (GAP) par la triose-phosphate isomérase (3). Finalement, le ²H en position C2 (bleu) du G-6P est incorporé lors de l'isomérisation entre le G-6P et le fructose-6P (F-6P) (4).

avant d'effectuer des mesures. De plus, la mesure des rapport C6/C2 et C5/C2 permet d'éviter la sous-estimation de la contribution réelle de la néoglucogénèse, due à la présence de glucose résiduel non marqué dans le pool circulant de glucose [Landau et al., 1995b]. En effet au repos, le taux de renouvellement du glucose est faible et le glucose non marqué, produit avant que l'équilibration isotopique n'ait été complétée, diminue l'enrichissement du C5 et du C6 du glucose par rapport à celui de l'eau, ce qui résulte en une sous-estimation de la contribution de la néoglucogénèse). Cette sous-estimation est toutefois mineure si la période d'observation est suffisamment longue pour que le glucose non marqué disparaisse de la circulation.

Bien que cette méthode, tout comme celle de la ^{13}C -RMN combinée à l'IRM, permette de contourner les problèmes associés au calcul d'un facteur de dilution isotopique dans le CAC, elle repose néanmoins sur quelques postulats reliés aux échanges et à l'équilibration isotopique. Pour que les estimations soit valides, il est en effet essentiel que les échanges entre les protons de l'eau et ceux des carbones 2, 5 et 6 du glucose soient complets, c'est à dire que l'enrichissement en deutérium des carbones du glucose soit équivalent à l'enrichissement de l'eau corporelle. Cette hypothèse doit être valide, peu importe que le calcul de la contribution de la néoglucogénèse soit fait avec le rapport APE C5 (ou C6) du glucose sur APE H_2O ou bien par les rapports C5/C2 et C6/C2 du glucose.

Il y a de bonnes évidences expérimentales qui montrent que, *in vitro* et *in vivo* chez le Rat, les échanges entre les hydrogènes du C2 et du C5 du glucose et ceux de l'eau corporelle sont complets [Guo et al., 1992; Kuwajima et al., 1986; Rognstad et al., 1974]. Chez l'Homme, Landau et al. [1996; 1995b] et Chandramouli et al. [1997] ont confirmé que les hydrogènes du C2 s'équilibraient complètement avec ceux de l'eau corporelle et ces auteurs ont conclu qu'il en était de même pour les hydrogènes du C5, compte tenu des résultats rapportés chez le Rat. Contrairement aux hydrogènes du C2 et du C5 du glucose, ceux du C6 ne s'équilibrent pas complètement avec l'eau corporelle et la contribution de la néoglucogénèse, à partir du PEP mesurée par le rapport APE C6/APE H_2O ou le rapport C6/C2, est donc sous-estimée [Landau et al., 1995b]. Deux

études menées chez le rongeur [Kuwajima et al., 1986; Rognstad et al., 1974] ainsi qu'une étude *in vivo* chez l'Homme [Taylor et al., 1966] montrent en effet que le degré d'équilibration est entre 80 et 90 %. Par ailleurs, Guo et al. [1992] ont rapporté des résultats conflictuels. Dans leur étude menée chez le Rat à jeun à la suite d'une infusion de $^2\text{H}_2\text{O}$, ces auteurs ont en effet rapporté un degré d'équilibration de 50 %. En tenant compte de l'ensemble de ces résultats, à l'exception de ceux de Guo et al. [1992] qui semblent conflictuels, la contribution de la néoglucogénèse à partir du PEP mesurée par la méthode de l' $^2\text{H}_2\text{O}$ serait donc vraisemblablement sous-estimée entre 10 et 20 % à cause de l'équilibration incomplète entre les hydrogènes du C6 du glucose et les protons de l'eau corporelle. Par contre, le rapport APE C5/APE H_2O et le rapport C5/C2 du glucose reflètent adéquatement la contribution de la néoglucogénèse totale.

Compte tenue de la nature de la méthode, il est également important de tenir compte de l'effet des divers cycles futiles ainsi que du recyclage d'intermédiaires de la glycolyse par la voie des pentoses et par la transaldolase sur l'incorporation d'hydrogène sur les carbones du glucose [Chandramouli et al., 1997; Landau et al., 1996; Petersen et al., 1999]. Les cycles futiles qui peuvent potentiellement affecter la mesure de la contribution de la néoglucogénèse sont le cycle du glucose (glucose \rightarrow G-6P \rightarrow glucose), le cycle du glycogène (activité simultanée de la glycogène synthase et de la glycogène phosphorylase) et le cycle G-6P-trioses-phosphates (glycogène \rightarrow trioses-P \rightarrow glucose).

Le cycle du glucose engendre théoriquement une sous-estimation de la néoglucogénèse puisque du $[2\text{-}^2\text{H}]\text{-glucose}$ est formé à partir du glucose circulant non marqué, capté par le foie et subséquemment relâché après avoir subi l'étape de l'isomérisation entre le G-6P et le F-6P. Toutefois, chez des sujets à jeun de 12 heures, la contribution du cycle du glucose à la production systémique de glucose a été estimée entre 11 et 20 % [Karlander et al., 1986; Rooney et al., 1993]. Compte tenu de cette contribution, la sous-estimation de la néoglucogénèse engendrée par l'activité de ce cycle serait donc d'environ 2 % [Landau et al., 1996].

L'activité simultanée de la glycogène synthase et de la glycogène phosphorylase engendre également une sous-estimation de la contribution de la néoglucogénèse si des molécules de G-6P marquées en C5 sont incorporées dans le glycogène en échange d'une molécule de G-6P non marquée, directement libérée en circulation. Il est connu que le recyclage du glycogène peut être important dans certaines conditions telles l'hyperinsulinémie induite par une infusion de glucose [Magnusson et al., 1994], un clamp hyperinsulinémique eu- ou hyperglycémique [Petersen et al., 1998] ou un clamp hyperglucagonémique [Roden et al., 1996]. Cependant, le recyclage du glycogène est indétectable chez des sujets sains à jeun [Petersen et al., 1998]. L'importance de la sous-estimation de la contribution de la néoglucogénèse à cause du recyclage du glycogène sera donc variable selon les conditions expérimentales.

Le cycle G-6P-trioses-phosphate engendre quant à lui une surestimation de la contribution de la néoglucogénèse puisque le G-6P issu du glycogène, qui transite par le pool des trioses-phosphates avant d'être relâché en circulation sous forme de glucose, se retrouve marqué en C5. Une activité négligeable du cycle G-6P-trioses-phosphates a été rapportée dans une étude chez le sujet sain à jeun [Karlender et al., 1986], alors que dans une autre étude [Magnusson et al., 1990], l'activité du cycle a été évaluée à 13 % du flux de phosphorylyse du G-6P en glucose. L'importance de la surestimation de la néoglucogénèse induite par l'activité de ce cycle a été évaluée entre 2 et 3 % par Landau chez des sujets à jeun de 12 heures [observation non publiée mais rapportée dans Petersen et al., 1999]. Ceci n'exclut pas que la néoglucogénèse puisse être plus importante dans certaines conditions favorisant l'activité du cycle G6P-trioses-phosphates.

Le métabolisme du G-6P et du F-6P, issu du glycogène par la voie des pentoses et celle de la transaldolase respectivement, donnera également lieu à une surestimation de la contribution réelle de la néoglucogénèse. En effet, une incorporation de deutérium en C5 du glucose aura lieu parce que les deux voies métaboliques ont comme intermédiaire un triose-phosphate (GAP). La surestimation de la contribution de la néoglucogénèse induite par l'activité du cycle des pentoses serait d'environ 2 à 3 % et,

l'influence de la transaldolase, qui n'a jamais été évaluée directement, serait vraisemblablement du même ordre de grandeur [Petersen et al., 1999].

Dans l'ensemble, la méthode de mesure de la contribution de la néoglucogénèse totale par le rapport C5/C2 de l'enrichissement en deutérium du glucose est préférable à la mesure par le rapport APE C5/APE H₂O parce qu'il n'est pas nécessaire d'attendre l'atteinte d'un état stable d'enrichissement. De plus, le rapport C5/C2 permet de limiter l'artefact dû à la présence de glucose non marqué produit avant la période d'équilibration isotopique. Le postulat qu'il existe un échange complet entre les protons de l'eau et ceux du C5 et du C2 est respecté. Finalement la somme nette des effets exercés par les différents cycles futiles et par la voie des pentoses ainsi que de la transaldolase sur la valeur du rapport C5/C2 est probablement très faible chez des sujets à jeun. Quant à la mesure de la contribution de la néoglucogénèse à partir du PEP, elle est probablement sous-estimée par un facteur compris entre 10 et 20 % à cause d'une équilibration incomplète entre les protons de l'eau et ceux du C6 du glucose.

2.3.3 Analyse de distribution d'isotopomères de masse

L'analyse de distribution d'isotopomères de masse (MIDA) est une technique qui a été développée par Hellerstein et Neese [1992]. MIDA a été utilisée pour des études chez le Rat [Hellerstein et al., 1997a; Mills et al., 1998; Neese et al., 1995; Peroni et al., 1997; Peroni et al., 1995; Previs et al., 1995; Turner et al., 1998; Wolf, 1995] et chez l'Homme [Dekker et al., 1997; Hellerstein et al., 1997; Landau et al., 1995a; Sunehag et al., 1997; Trimmer et al., 1998] dans différentes conditions physiologiques (jeûne, ingestion d'éthanol, exercice) et physiopathologiques (diabète, malaria, souris *ob/ob*).

MIDA est une technique puissante qui permet d'étudier la synthèse de n'importe quelle molécule polymérique, formée à partir de sous unités identiques marquées avec du ¹⁵N, du ¹³C ou du ²H [Hellerstein et Neese, 1992]. Les polymères ainsi synthétisés se caractérisent par une distribution d'isotopomères de masse qui peut être prédite à partir de l'enrichissement isotopique (*p*) de la sous unité précurseur en utilisant l'analyse de probabilité et les expansions polynômiales. Par conséquent, l'analyse de distribution

des isotopomères de masses dans la molécule synthétique permet de calculer la valeur de p ainsi que la fraction des molécules de polymères qui a été nouvellement synthétisée(s) à partir du précurseur marqué (f). La fraction $1-f$ des molécules synthétiques non marquées provenant d'autres sources que le précurseur marqué peut également être déterminée.

Pour l'étude de la néoglucogénèse, le glucose peut être considéré comme un dimère formé de deux sous unités trioses (DHAP et GAP) (Figure 14). La valeur de p correspond à l'enrichissement du pool de trioses-phosphate, f correspond à la fraction du glucose circulant synthétisé à partir du pool de trioses-phosphates soit la contribution de la néoglucogénèse et $1-f$ correspond à la fraction du glucose circulant issue d'autres sources que les trioses-phosphates (du glycogène en période de jeûne ainsi que des glucides ingérés provenant de l'intestin). La figure 14 présente un exemple de distribution d'isotopomères de masse du glucose lorsque du $[U-^{13}C_3]$ -glycérol ($M3$ -glycérol) est infusé. Dans cette condition, la majeure partie des isotopomères de masse du glucose sont des $M0$, $M3$ et $M6$ ($M0_{\text{glucose}}$, $M3_{\text{glucose}}$, $M6_{\text{glucose}}$) et les isotopomères de masse des trioses-phosphates (DHAP et GAP) sont des $M0$ et $M3$ ($M0$ et $M3_{\text{GAP}}$; $M0$ et $M3_{\text{DHAP}}$). L'expression mathématique des différents isotopomères de glucose possibles lors d'une telle expérience sont les suivantes:

Équation 15:
$$M6_{\text{glucose}} = f [M3_{\text{GAP}} M3_{\text{DHAP}}]$$

Équation 16:
$$M3_{\text{glucose}} = f [M0_{\text{GAP}} M3_{\text{DHAP}} + M3_{\text{GAP}} M0_{\text{DHAP}}]$$

En supposant un équilibre isotopique complet entre le DHAP et le GAP les équations 15 et 16 peuvent être exprimées de la manière suivante:

Équation 17:
$$M6_{\text{glucose}} = f [M3_{(\text{TP})}]^2$$

Équation 18:
$$M3_{\text{glucose}} = 2f [M0_{(\text{TP})} M3_{(\text{TP})}]$$

Où $M3_{(\text{TP})}$ est l'abondance relative des isotopomères $M3$ des deux trioses-phosphates.

En faisant l'approximation que les isotopomères $M0$ du glucose sont équivalents à $1-M3_{\text{glucose}}$ (des quantités négligeables de $M6$ glucose sont formées), il est possible à partir du ratio des isotopomères de masse du glucose, de déterminer l'enrichissement

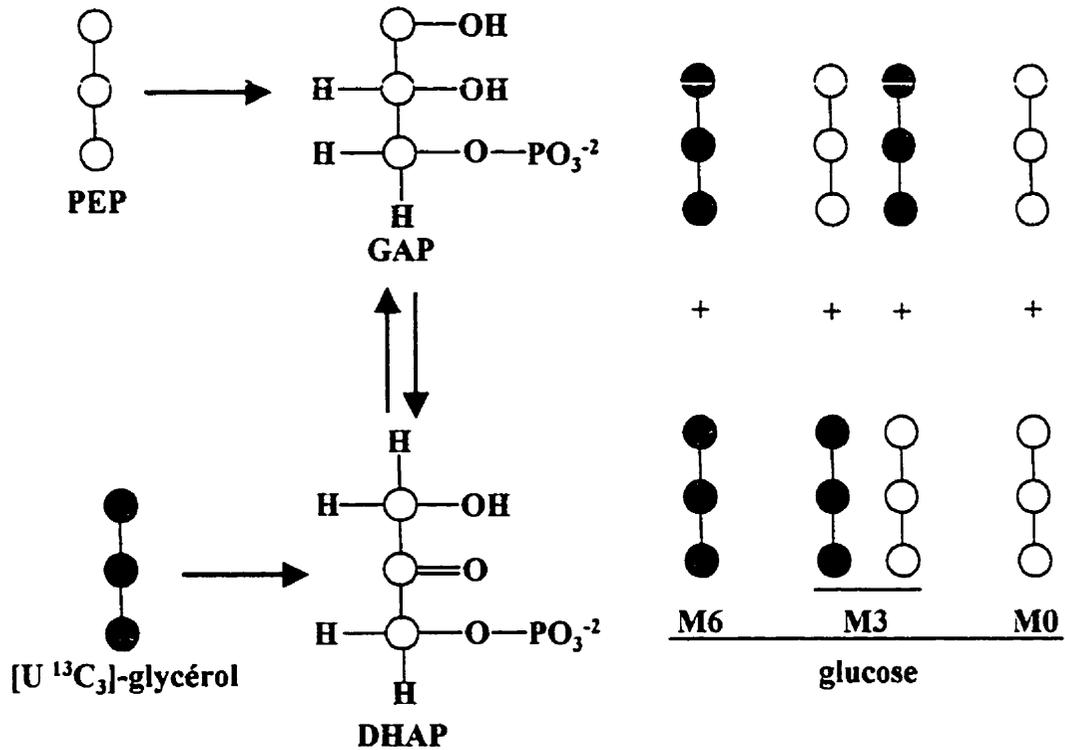


Figure 14: Distribution d'isotopomères de masse du glucose lorsque du [U ¹³C₃]-glycérol est infusé. Le glucose est une molécule dimérique constituée de deux sous-unités de trioses-phosphates (1 GAP et 1 DHAP). Lorsque le pool des trioses phosphates est marqué à l'aide d'une infusion de M3 glycérol (M = isotopomère de masse, 3 = nombre d'atomes de ¹³C présent sur la molécule, indépendamment de leur position spécifique), des isotopomères de masse M6, M3 et M0 sont obtenus à partir de la combinaison de 2, 1 ou 0 molécules de trioses-phosphates marqués. L'enrichissement des trois carbones du glucose issu du GAP est égal à celui des trois carbones issus du DHAP à cause de l'équilibration rapide de la trioses-phosphate isomérase.

isotopique du pool de trioses-phosphates ($M3_{(TP)}$ ou p selon la notation d'Hellerstein et Neese [1992]):

Équation 19:
$$M6_{\text{glucose}} / M3_{\text{glucose}} = M3_{(TP)} / [2M0_{(TP)}] = M3_{(TP)} / [2(1 - M3_{(TP)})]$$

En utilisant la valeur de p déterminée à l'aide du rapport $M6_{\text{glucose}} / M3_{\text{glucose}}$ il est alors possible de déterminer la fraction du glucose produite qui est issu de la néoglucogénèse (f):

Équation 20:
$$f = M3_{\text{glucose}} / [2p \cdot (1 - p)] = M6_{\text{glucose}} / p^2$$

Le marquage du pool hépatique de trioses-phosphate peut en théorie se faire en utilisant n'importe quelle molécule précurseur des trioses-phosphates ($[2-^{13}\text{C}_1]$ -glycérol, $[\text{U}-^{13}\text{C}_3]$ -glycérol, $[2-^{13}\text{C}_1]$ -lactate ou $[\text{U}-^{13}\text{C}_3]$ -lactate) [Brunengraber et al., 1997]. Cependant, le traceur le plus fréquemment utilisé est le $[2-^{13}\text{C}_1]$ -glycérol, qui selon Neese et al. [1995] est le plus approprié.

Les trois conditions essentielles pour que la contribution de la néoglucogénèse mesurée par MIDA soit valide sont 1) que l'enrichissement des deux trioses-phosphates (GAP et DHAP) soit égal en tout temps, 2) que l'enrichissement du pool de trioses-phosphate (p) soit le même dans l'ensemble des cellules qui font de la néoglucogénèse et, 3) que la contribution de la néoglucogénèse (f) soit la même dans toutes les cellules [Brunengraber et al., 1997; Previs et al., 1998]. Il existe actuellement de grandes divergences d'opinion quant à la validité de MIDA pour mesurer la contribution de la néoglucogénèse [Brunengraber et al., 1997; Dekker et al, 1997; Siler et al., 1998]. Les divergences concernent plus particulièrement les conditions 2 et 3 citées précédemment. En effet, Neese et al. [1995] ont bien démontré que la triose-phosphate isomérase fonctionnait à l'équilibre et que l'erreur sur la mesure de f était de moins de 1 %, lorsque l'équilibration isotopique entre DHAP et DAP était incomplète.

Sur des foies perfusés de Rats à jeun de 48 heures, Previs et al. [1995] ont rapporté des valeurs anormalement basses (75 %) pour la contribution de la néoglucogénèse en utilisant MIDA avec du $[\text{U}-^{13}\text{C}_3]$ -glycérol. Des résultats similaires ont également été rapportés chez l'humain à jeun de 60 heures [Landau et al., 1995a].

Previs et al. [1995] et Landau et al. [1995a] ont émis l'hypothèse que cette sous-estimation de f était due à l'existence de plusieurs pools de trioses-phosphate possédant des enrichissements isotopiques différents (soit la condition 2 citée précédemment non respectée). La figure 15, extraite de l'étude de Previs et al. [1995], illustre bien la nature de l'erreur introduite par l'existence d'une hétérogénéité de p . Dans cet exemple, on suppose une contribution égale à la production hépatique de glucose de deux pools distincts de glucose, synthétisés à partir de deux pools de trioses-phosphate. Les enrichissements respectifs des deux pools de trioses-phosphate (p) sont de 20 et 5 % et dans chacun de ces deux pools la contribution de la néoglucogénèse est de 100 % ($f1 = f2$). Previs et al. [1995] ont montré que le calcul de f à partir de la distribution d'isotopomères de masse du glucose sortant du foie donnait des valeurs erronées ($f = 73,5$ % au lieu de 100 %). Ces auteurs ont démontré que les valeurs calculées des paramètres à la sortie du foie (p , M3, M6 et M6/M3) ne représentaient pas des moyennes arithmétiques de ces mêmes paramètres dans les deux pools de trioses-phosphate.

L'existence de plusieurs pools de trioses-phosphate possédant des enrichissements isotopiques différents est vraisemblablement due à deux phénomènes. Le premier est qu'il existe un important gradient porto-veineux en glycérol chez le Rat, le Chien et l'humain si bien que, *in vivo* ou lors de perfusions de foie isolés, les hépatocytes péri-veineux sont soumis à une concentration de glycérol entre 4 et 5 fois inférieure à celle que peuvent rencontrer les hépatocytes périportaux [Landau et al., 1996a; Previs et al., 1998; Previs et al., 1996]. Le second phénomène est qu'il existe une zonation métabolique dans les lobules hépatiques, qui fait en sorte que l'enrichissement isotopique du pool des trioses-phosphate est différent dans les hépatocytes périportaux et périveineux, même si les deux populations de cellules sont soumises aux mêmes concentrations de glycérol ou de lactate-pyruvate [Previs et al., 1998].

Les résultats rapportés par Previs et al. [1995] ainsi que Landau et al. [1995a] sont apparemment en désaccord avec ceux de Neese et al. [1995] et de Péroni et al. [1997; 1995]. Ces derniers auteurs ont utilisé la même méthode mais avec du [2-¹³C₁]-glycérol plutôt que du [U-¹³C₃]-glycérol chez le Rat à jeun de 48 heures. Ces auteurs

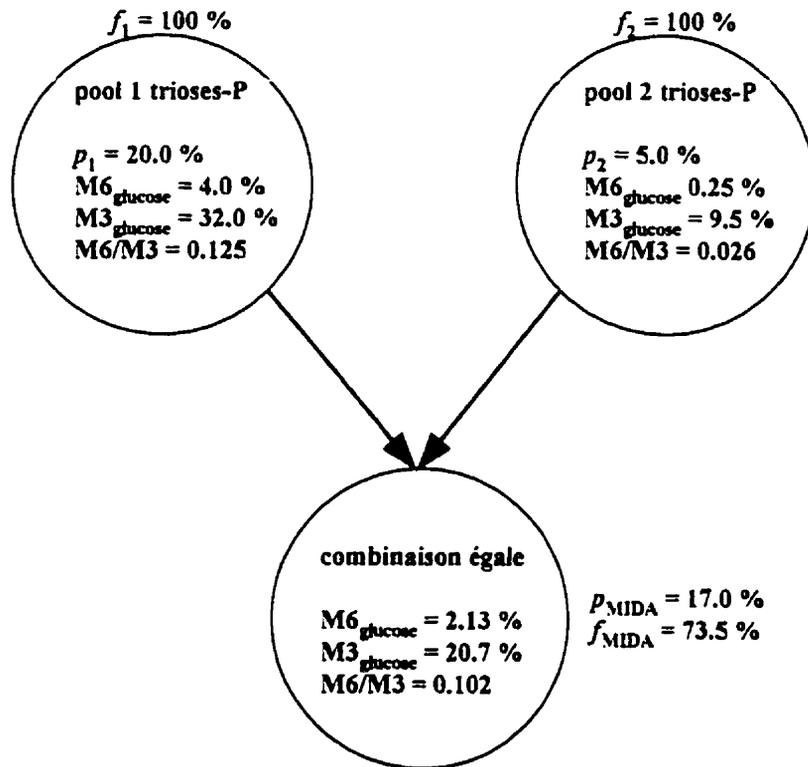


Figure 15: Combinaison de deux pools de glucose de taille égale formés à partir de deux pools de trioses-phosphates marqués au $[U \text{ }^{13}\text{C}_3]$ -glycérol ayant un enrichissement isotopique différent. L'enrichissement isotopique (% MPE) du pool de trioses-phosphates 1 (p_1) et 2 (p_2) est de 20 et 5 % respectivement. La contribution de la néoglucogenèse (f_1 et f_2) dans chaque pool primaire est de 100 %. Le pool combiné (dont les paramètres peuvent être mesurés dans l'effluent du foie) affiche une distribution d'isotopomères de masse du glucose à partir de laquelle des valeurs artéfactuelles de f_{MIDA} sont calculées (73.5 %). $M_{1\text{gluc}}$, $M_{6\text{gluc}}$: enrichissement molaire en excès (%) des isotopomères de masse M+1 et M+6. Cette figure est tirée de l'étude de Previs et al. [1995].

[Neese et al., 1995; Péroni et al., 1997; Péroni et al., 1995] ont en effet trouvé des valeurs de f voisines de 100 %. Previs et al. [1998] ont écarté la possibilité que ces résultats divergeants soient dus à l'utilisation de [2- $^{13}\text{C}_1$]-glycérol au lieu du [U- $^{13}\text{C}_3$]-glycérol. Selon ces auteurs, cette différence serait plutôt attribuable au fait que dans les études de Neese et al. [1995] et de Péroni et al. [1997;], la quantité de ^{13}C -glycérol utilisée était beaucoup plus importante que celle utilisée par Landau et al. [1995a] et Previs et al. [1998; 1995]. Sur des foies isolés perfusés, provenant de Rats à jeun de 48 heures, Previs et al. [1995] ont en effet démontré que lorsque la concentration de glycérol perfusé passait de 0,1 mM à 1,5 mM, la valeur de f passait de 75 à 92 %. Sur des hépatocytes isolés incubés avec du ^{13}C -glycérol et du lactate-pyruvate non marqué à des ratios de concentration croissante, Previs et al. [1998] ont également montré que la valeur de f passait de 73 à 92 % lorsque le ratio [^{13}C -glycérol] / [^{12}C -lactate-pyruvate] passait de 0,23 (ratio physiologique) à 3,6. Dans l'ensemble, les deux études de Previs et al. [1998; 1995] montrent que des valeurs plausibles de f peuvent être obtenues seulement lorsque des concentrations non physiologiques de ^{13}C -glycérol sont utilisées, ce qui expliquerait les résultats de Neese et al. [1995] et Péroni et al. [1997; 1995]. Récemment, Previs et al. [1999] ont confirmé ces résultats *in vivo* chez la Souris et ont également montré que les concentrations de [2- $^{13}\text{C}_2$]-glycérol nécessaires pour obtenir une valeur de f plausible étaient suffisamment élevées pour perturber le métabolisme du glucose et du glycérol.

2.3.4 Enrichissement préalable du glycogène au ^{13}C

En 1994, l'équipe de Tappy à Lausanne a proposé une nouvelle méthode permettant d'estimer la contribution de la néoglucogénèse [Gay et al., 1994a] à la production hépatique de glucose. Cette technique a pour la première fois été utilisée pour mesurer la contribution de la néoglucogénèse chez des sujets sains à jeun depuis 12 à 14 heures [Gay et al., 1994a]. Plus récemment, elle a également été utilisée par la même équipe pour estimer la contribution de la néoglucogénèse chez des patients non diabétiques maigres et obèses [Müller et al., 1997]. Bien qu'à priori les résultats obtenus à l'aide de cette méthode soient compatibles avec les données obtenues à l'aide de la ^{13}C -RMN couplée à l'IRM [Petersen et al., 1999; Petersen et al., 1996; Rothman et al.,

1991] ainsi que de la méthode de l' $^2\text{H}_2\text{O}$ [Chandramouli et al, 1997; Kalhan et al., 1997; Landau et al., 1996; Petersen et al., 1999], la validité d'importants postulats de départ a été mise en doute [Chandramouli et al., 1997; Petersen et al., 1996].

La méthode proposée par Gay et al. [1994a] est assez différente des autres techniques isotopiques présentées dans les sections précédentes. Brièvement, les réserves de glycogène hépatique sont d'abord enrichies à l'aide d'une diète contenant des glucides naturellement ou artificiellement enrichis en ^{13}C . Après quelques jours de diète, lorsque les réserves de glycogène ont théoriquement atteint l'enrichissement isotopique des glucides de la diète, la contribution fractionnelle de la glycogénolyse ainsi que de la néoglucogénèse est calculée à partir de l'enrichissement en ^{13}C du glucose circulant et du glycogène hépatique. En supposant que tout le ^{13}C -glucose plasmatique est issu de la glycogénolyse, sa contribution fractionnelle à la production de glucose est donnée par l'équation suivante:

Équation 21:
$$\text{Glycogénolyse (\%)} = \frac{[^{13}\text{C} / ^{12}\text{C} \text{ glucose plasmatique}]}{[^{13}\text{C} / ^{12}\text{C} \text{ glycogène}]}$$

En supposant que la quantité de ^{13}C recyclée par la néoglucogénèse est négligeable, la contribution fractionnelle de la néoglucogénèse est obtenue par différence:

Équation 22 :
$$\text{Néoglucogénèse (\%)} = 100 - \text{Glycogénolyse (\%)}$$

L'originalité de cette méthode, qui est d'ailleurs le point de litige majeur [Chandramouli et al., 1997; Petersen et al., 1996], est que l'enrichissement en ^{13}C du glycogène n'est pas directement mesuré, mais bien estimé à l'aide de l'enrichissement en ^{13}C du CO_2 expiré au repos et de la calorimétrie indirecte respiratoire corrigée pour l'excrétion urinaire d'azote. Dans l'étude de Gay et al. [1994a] effectuée chez des sujets au repos et à jeun entre 12 et 14 heures, les échanges gazeux respiratoires et l'excrétion urinaire d'azote sont mesurés. L'oxydation des protéines est calculée à l'aide de l'équation suivante:

Équation 23:
$$M_{\text{prot}} = 0,00625 \cdot N$$

Où N est l'excrétion urinaire d'azote en g/min. Étant donné que l'oxydation de 6,25 mg de protéines (équivalent à 1 mg d'azote) requiert 6,31 mL d'O₂ et 5,27 mL de CO₂, le VO₂, le VCO₂ ainsi que le RER (Ratio Exchange Respiratory) non protéique peuvent être calculés d'après les équations ci-dessous:

Équation 24: $VO_{2np} = VO_2 - VO_{2p}$

Équation 25: $VCO_{2np} = VCO_2 - VCO_{2p}$

Équation 26: $RER_{np} = VCO_{2np} / VO_{2np}$

L'oxydation nette du glucose et des lipides est calculé à l'aide des équations suivantes:

Équation 27: $M_{\text{glucose}} = 4,39 \cdot VCO_{2np} - 3,05 \cdot VO_{2np}$

Équation 28: $M_{\text{lipides}} = (VO_{2np} - VCO_{2np}) / 1,63$

Où la masse de glucose et de lipides est en g/min, le VO_{2np} et le VCO_{2np} en L/min.

Gay et al. [1994a] ont suggéré que lorsque le glycogène est enrichi en ¹³C et que le rapport ¹³C/¹²C des lipides et des protéines endogènes est demeuré proche de l'enrichissement naturel retrouvé avant le début de la diète, il est possible de calculer l'oxydation du glycogène. Selon ces auteurs, en situation post prandiale et au repos, l'oxydation du ¹³C-glycogène est la seule source de ¹³CO₂ (Figure 16). De plus, la lipogénèse et la synthèse d'acides aminés (qui sont comptés dans l'oxydation nette du glucose par calorimétrie indirecte respiratoire) sont négligeables. L'oxydation nette du glucose, mesurée par calorimétrie indirecte respiratoire, correspond donc, en première approximation, à l'oxydation par les tissus périphériques du glycogène. L'oxydation nette des lipides produit du ¹²CO₂ et inclut l'oxydation des acides gras et l'oxydation du glucose issu de la néoglucogénèse à partir du glycérol. L'oxydation nette des protéines produit également du ¹²CO₂ et inclut l'oxydation directe des acides aminés et l'oxydation du glucose issu de la néoglucogénèse à partir des acides aminés.

Selon Gay et al. [1994a], le CO₂ produit par l'oxydation du glucose a un enrichissement en ¹³C qui correspond à celui du glycogène. Étant donné que ce volume

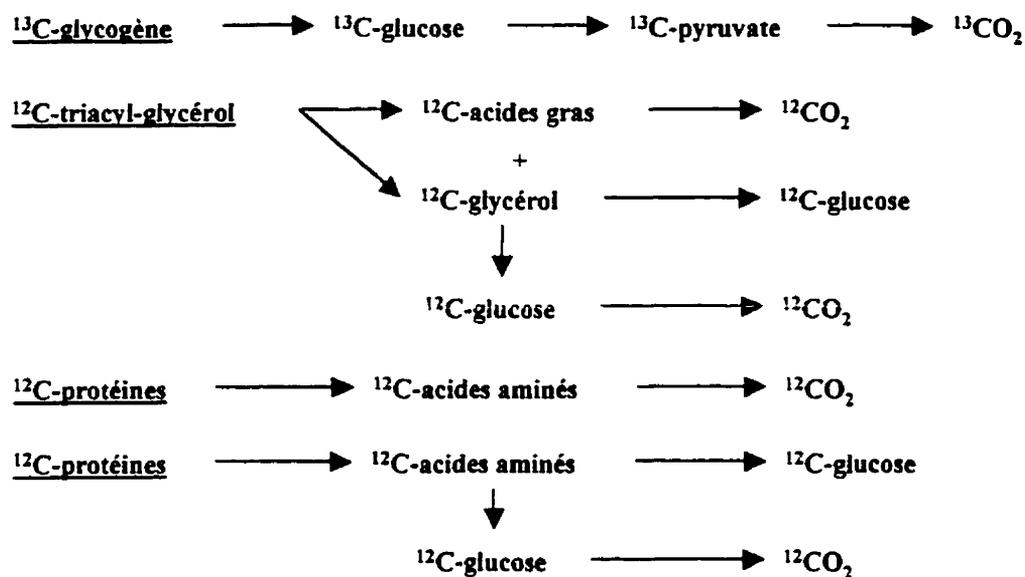


Figure 16: Source de $^{13}\text{CO}_2$ lorsque le glycogène est sélectivement enrichi à l'aide d'une diète contenant des glucides marqués en ^{13}C . Lorsque le glycogène est enrichi en ^{13}C et que le pool endogène d'acides aminés et de lipides est demeuré pauvre en ^{13}C , il est théoriquement possible de calculer l'enrichissement en ^{13}C du glycogène à partir des échanges gazeux respiratoires, de l'excrétion urinaire d'azote, et de la mesure de l'enrichissement isotopique du CO_2 expiré au repos en période post-absorbative.

de $^{13}\text{CO}_2$ est dilué par le $^{12}\text{CO}_2$ issu de l'oxydation des acides gras et des protéines, il est nécessaire d'avoir recours à l'équation suivante pour calculer l'enrichissement en ^{13}C du glycogène à l'aide du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du CO_2 expiré:

$$\text{Équation 29:} \quad [^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}] \text{ CO}_2 = (^{13}\text{C} / ^{12}\text{C})_{\text{Glycogène}} \times \text{VCO}_{2\text{glucose}} / \text{VCO}_{2\text{total}} \times 0,8$$

Où $\text{VCO}_{2\text{glucose}}$ est la fraction du volume total de CO_2 issu de l'oxydation du glucose et 0,8 est le facteur de recouvrement du CO_2 au repos. $\text{VCO}_{2\text{glucose}}$ est obtenu à l'aide de la masse de glucose oxydée et de l'équivalent en CO_2 du glucose (L/g):

$$\text{Équation 30:} \quad \text{VCO}_{2\text{glucose}} = 0,747 \times \text{M}_{\text{glucose}}$$

L'équation 29 peut être simplifiée afin de calculer l'enrichissement en ^{13}C du glycogène de la façon suivante:

Équation 31:

$$^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ Glycogène} = (^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ CO}_2 \times \text{VCO}_{2\text{total}}) / (\text{VCO}_{2\text{glucose}} \times 0,8)$$

En somme, il y a trois postulats sous-jacents à la méthode proposée par Gay et al. [1994a]. Le première est que la diète contenant des glucides naturellement ou artificiellement enrichis en ^{13}C n'enrichit pas de manière significative le pool endogène d'acides gras et d'acides aminés. En effet, si tel était le cas, le glycogène ne serait pas l'unique source de $^{13}\text{CO}_2$, et le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du CO_2 expiré ne serait pas représentatif de celui du glycogène. Gay et al. [1994a] ont montré que cette hypothèse était valide en mesurant l'enrichissement en ^{13}C des lipoprotéines à très faible densité (VLDL) et des protéines plasmatiques pendant les cinq jours de diète. Aucun enrichissement significatif n'a été observé même au cinquième jour. Romijn et al. [1992] avaient également rapporté que les triglycérides, les acides gras libres et les protéines plasmatiques ne s'enrichissaient pas en réponse à un régime de surcompensation des réserves de glycogène, composé de glucides naturellement enrichis en ^{13}C (glucose issu du maïs).

Le deuxième postulat de base est que l'enrichissement en ^{13}C du glycogène synthétisé a atteint un enrichissement équivalent à celui des glucides contenus dans la diète. Plusieurs études concernant les mécanismes de synthèse du glycogène hépatique suggèrent que cette hypothèse pourrait ne pas être valide. En effet, dans le foie, une

fraction importante de la synthèse de glycogène s'effectue par la voie indirecte, c'est à dire par une voie néoglucogénique [Magnusson et Shulman, 1991a; Magnusson et al., 1989; Radziuk J., 1989; Radziuk, 1989a; Radziuk, 1982a; Shulman et al., 1991]. Chez des sujets à jeun de 12 heures à qui une charge de glucose orale ou intraveineuse est administrée, la contribution de la voie indirecte à la synthèse de glycogène est estimée entre 35 et 50 % [Magnusson et al., 1987; Radziuk, 1982a; Radziuk, 1989; Radziuk, 1989a; Shulman et al., 1990; Shulman et al., 1991]. Chez des sujets nourris à qui des doses comparables de glucose ont été administrées, la contribution de la voie indirecte, bien que moindre que chez les sujets à jeun, demeure malgré tout entre 23 et 31 % [Magnusson et al., 1989; Shulman et al., 1991; Shulman et al., 1990]. Comme il a été mentionné à la section 2.1.3, l'emprunt de la voie néoglucogénique engendre d'importants phénomènes de dilution et d'échanges isotopiques. À priori, il apparaît donc difficile que l'enrichissement en ^{13}C du glycogène hépatique puisse atteindre un niveau équivalent à celui des glucides contenus dans la diète.

Récemment, l'équipe de Tappy [Müller et al., 1997] a d'ailleurs trouvé que l'enrichissement en ^{13}C du glycogène hépatique mesuré sur un échantillon prélevé par biopsie à l'aiguille était 66 % inférieur à l'enrichissement en ^{13}C des glucides de la diète ($0,02 \pm 0,009$ vs $0,062 \pm 0,007$ APE respectivement), ainsi que du CO_2 issu de l'oxydation du glycogène. L'enrichissement réel du glycogène était même inférieur à l'enrichissement en ^{13}C du glucose plasmatique ($0,042 \pm 0,003$ APE). D'après ces auteurs [Müller et al., 1997], cette observation suggère l'existence de deux pools distincts de glycogène hépatique. Un premier pool à renouvellement lent qui ne s'enrichirait pas en ^{13}C et ne contribuerait pas à la production hépatique de glucose, et un second pool à renouvellement rapide dont le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ serait égal à celui des glucides de la diète. Cependant, à défaut de pouvoir vérifier ces hypothèses, il est également possible que les résultats plausibles de la contribution de la néoglucogénèse qui ont été obtenus jusqu'à présent à l'aide de cette méthode soient un artefact.

Enfin, la troisième hypothèse inhérente à la méthode proposée par Gay et al. [1994a] concerne la validité de la mesure indirecte de l'enrichissement du glycogène

hépatique à partir de l'enrichissement isotopique du CO₂ expiré. Sur ce point, il est très probable que les acides gras et les protéines ne soient pas une source de ¹³C puisque leur pool endogène ne s'enrichit pas de manière significative [Gay et al. 1994a; Romijn et al., 1992]. Par contre, il n'est pas exclu que l'oxydation du glycogène musculaire enrichi en ¹³C soit une source d'erreur. Au repos à l'état post prandial, la dépense énergétique des muscles squelettiques représente 20 % du métabolisme de base [Zurlo et al., 1990] et ils consomment un mélange de glycogène (et/ou de glucose circulant) et d'acides gras [Kelley et al., 1993]. À priori, tel que Gay et al. [1994a] l'ont mentionné, l'erreur introduite par l'oxydation d'une si faible masse de glycogène musculaire enrichi en ¹³C est faible. Cependant, si l'enrichissement en ¹³C du glycogène musculaire oxydé est supérieur à celui du glycogène hépatique, l'erreur pourrait devenir significative. Chez les mammifères, il est généralement accepté que la principale voie de synthèse du glycogène dans le muscle est la voie directe [Gleeson, 1996; Johnson et Bagby, 1988], bien que le laboratoire de Radziuk [Ryan and Radziuk, 1994] ait rapporté une contribution de la néoglycogénèse entre 35 et 40 %. Il est donc possible que l'enrichissement en ¹³C du glycogène musculaire soit substantiellement plus élevé que celui du glycogène hépatique; ce qui pourrait mener à une surestimation de l'enrichissement réel du glycogène hépatique lorsque celui-ci est calculé à partir de l'enrichissement en ¹³C du CO₂ expiré issu de l'oxydation du glucose.

Dans l'ensemble, bien que la méthode de marquage des réserves de glycogène hépatique proposée par Gay et al. [1994a] ait donné des résultats plausibles concernant la contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose au repos à l'état post prandial [Gay et al. 1994a; Müller et al., 1997], il est possible que ceci ne soit le fruit que du hasard.

.3 Contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose

.3.1 *Contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose au repos*

.3.1.1 Contribution relative et absolue de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose

Le but de cette courte section n'a pas été de faire une synthèse exhaustive de l'ensemble des études qui ont mesuré la contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose au repos, mais plutôt de donner un aperçu de l'état actuel des connaissances. Par conséquent, les données qui sont présentées proviennent d'études qui ont utilisé des méthodes considérées actuellement comme étant les plus fiables (^{13}C -RMN, $^2\text{H}_2\text{O}$, MIDA). Les résultats obtenus à l'aide de la différence artérioveineuse sont présentés à titre comparatif.

Le tableau 2 présente les résultats d'études qui ont mesuré la contribution totale de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose chez l'Homme au repos avec la ^{13}C -RMN [Petersen et al., 1999; Petersen et al., 1996; Rothman et al., 1991], l' $^2\text{H}_2\text{O}$ [Chandramouli et al., 1997; Kalhan et al., 1997; Landau et al., 1996; Petersen et al., 1999], MIDA avec le $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ -glycérol [Hellerstein 1997; Siler et al., 1998] ainsi qu'à la biopsie hépatique à l'aiguille [Nilsson et Hultman 1973b]. Le tableau 3 présente quant à lui un sommaire des résultats obtenus à l'aide de la balance hépatique en précurseurs glucoformateurs [Ahlborg et Björkman, 1990; Ahlborg et al., 1986; Ahlborg et Felig, 1982; Ahlborg et Felig, 1977; Björkman and Eriksson, 1983; Björkman et al., 1981; Chiasson et al., 1975; Mæhlum et al., 1976; Sestoft et al. 1977; Wahren et al., 1975; Wahren et al., 1971]. La figure 17 présente finalement une synthèse des résultats des études présentées dans les tableaux 2 et 3 en ordre croissant de durée de jeûne.

En utilisant la ^{13}C -RMN, Petersen et al. [1996] ont rapporté une contribution moyenne de la néoglucogénèse de 54 % à la production hépatique de glucose entre la 5^{ème} et la 12^{ème} heure de jeûne. Toujours avec la même technique, Rothman et al. [1991]

Tableau 2: Sommaire des études qui ont mesuré la contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose chez l'Homme au repos à l'aide de la ^{13}C -RMN, l' $^2\text{H}_2\text{O}$, MIDA et la biopsie hépatique.

Référence	Technique	# hres à jeun	GNG (% R_a glucose)
Chandramouli et al. [1997]	$^2\text{H}_2\text{O}$	13,5-16	54
		21,5- 24	64
Hellerstein et al. [1997]	MIDA [$2\text{-}^{13}\text{C}_1$]-glycérol	12-14	39
		60-64	80
Kalhan et al. [1997]	$^2\text{H}_2\text{O}$	16	67
Landau et al. [1995]	$^2\text{H}_2\text{O}$	60	86
Landau et al. [1996]	$^2\text{H}_2\text{O}$	14	47
		22	67
		42	93
Magnusson et al. [1992]	^{13}C -RMN	23	69
Nilsson et Hultman [1973]	Biopsie hép. (1,8L)	12-14	38
	Biopsie hép. (1,5L)	12-14	49
Petersen et al. [1996]	^{13}C -RMN	5-12	54
Petersen et al. [1999]	^{13}C -RMN	14-19	54
	$^2\text{H}_2\text{O}$	14-19	61

Référence	Technique	# hres à jeun	GNG (% R _e glucose)
Rothman et al. [1991]	¹³ C-RMN	0-22	65
		22-46	81
		46-64	95
Siler et al. [1998]	MIDA [2- ¹³ C ₁]-glycérol	12-14	30

Tableau 3: Sommaire des études qui ont mesuré la contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose chez l'Homme à jeun à l'aide de la différence artérioveineuse hépatique.

Référence	# hres à jeun	R _a glucose ($\mu\text{mol/kg/min}$)	GNG lactate (%R _a)	GNG glycérol (%R _a)	GNG alanine (%R _a)
Ahlborg et al. [1977]	12-14	10,79	16,5	2,4	3,51
Ahlborg et al. [1986,1990]	12-14	14,46	8,9	2,3	
Ahlborg et Felig [1982]	12-14	11,29	9,8	3,0	
Björkman et Eriksson [1983]	12-14	8,49	21,8	4,6	7,7
	60	4,39	54,7	14,3	19,0
Bjorkman et al. [1981]	12-14	8,84	25,38	4,3	7,6
Chiasson et al. [1975]	12-14	11,90	13,8	5,4	8,6
Wahren et al. [1971]	12-14	10,47	11,4	3,9	
		10,76	12,8	3,0	
		10,56	17,9	4,6	

Référence	# hres à jeun	R_a glucose ($\mu\text{mol/kg/min}$)	GNG lactate (%R _a)	GNG glycérol (%R _a)	GNG alanine (%R _a)	
Wahren et al. [1975]	12-14	8,17	14,8	2,1		
MOYENNE \pm SEM	12-14	10,57 \pm 1,78	15,3 \pm 5,0	3,6 \pm 1,1	6,9 \pm 2,3	GNG totale (% R _a)
						24,9

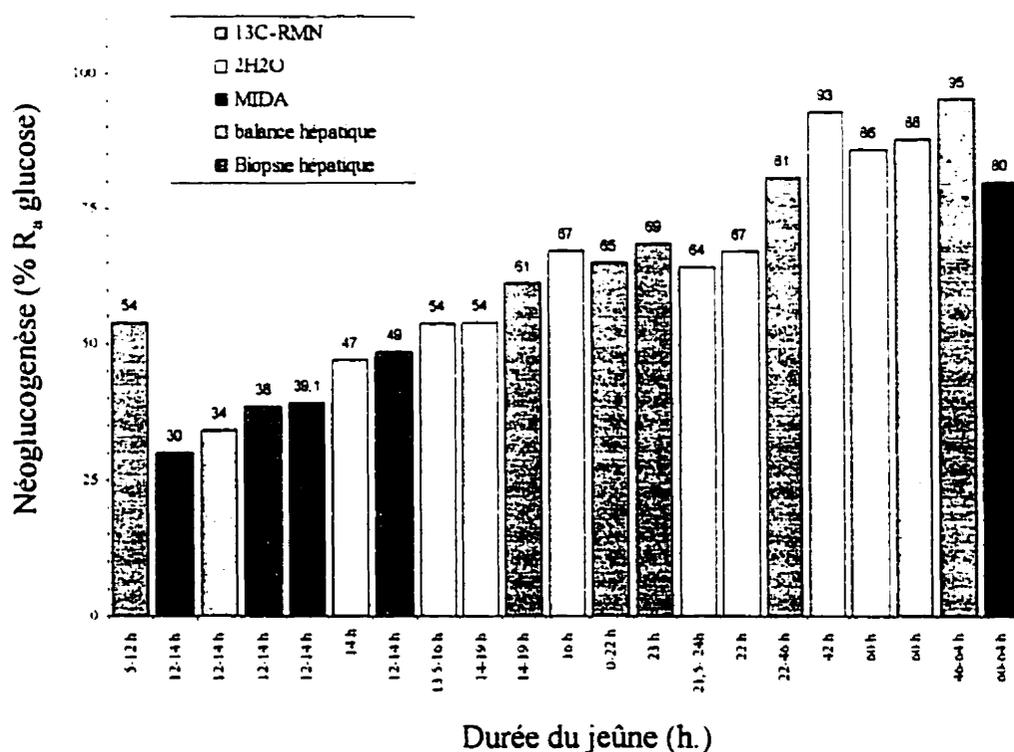


Figure 17: Contribution relative de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose au repos chez des sujets en période postprandiale immédiate et en réponse au jeûne de durée croissante. La figure résume les données du Tableau 2. La contribution de la néoglucogénèse mesurée par Nilsson et Hultman [1973] à l'aide de la biopsie hépatique est présentée deux fois. La première valeur (38 %) correspond au résultat publié, tandis que la seconde correspond à la valeur corrigée pour le volume hépatique, qui a été surestimée dans la publication originale [Peterssen et al., 1996].

ont, quant à eux, rapporté une contribution moyenne de 65 % durant les 22 premières heures de jeûne et de 95 % entre la 46^{ème} et la 64^{ème} heure. Avec l'²H₂O, des contributions relatives de 47, 54, 67 et 93 % ont été rapportées après 14, 13,5-19, 19 et 42 heures de jeûne respectivement [Chandramouli et al., 1997; Kalhan et al., 1997; Landau et al., 1996]. Petersen et al. [1999] ont utilisé de façon simultanée la ¹³C-RMN et l'²H₂O pour mesurer la contribution de la néoglucogénèse entre la 14^{ème} et la 19^{ème} heure de jeûne chez des sujets sains et cirrhotiques. Chez les sujets sains, ces auteurs [Petersen et al., 1999] ont obtenus des contributions relatives de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose de 61 et 54 % à l'aide de la ¹³C-RMN et l'²H₂O respectivement.

Nilsson et Hultman [1973b] ont utilisé la biopsie hépatique à l'aiguille pour mesurer la contribution de la glycogénolyse à la production hépatique de glucose chez des sujets sains à jeun entre 12 et 14 heures. En supposant un volume hépatique de 1,8 L, ces auteurs [Nilsson et Hultman, 1973b] ont trouvé qu'entre 57 et 67 % de la production hépatique de glucose provenait de la glycogénolyse et que la néoglucogénèse contribuait entre 33 et 43 %. La contribution de la néoglucogénèse rapportée par ces auteurs [Nilsson et Hultman, 1973b] est donc environ 25 % plus basse que les valeurs rapportées avec la ¹³C-RMN et l'²H₂O [Chandramouli et al., 1997; Kalhan et al., 1997; Landau et al., 1996; Petersen et al., 1999; Petersen et al., 1996; Rothman et al., 1991]. Cependant, selon Petersen et al. [1996] le volume hépatique de 1,8 L utilisé par Nilsson et Hultman [1973] est trop élevé et contribue à surestimer le flux glycogénolytique. En utilisant un volume hépatique de 1,5 L, tel que mesuré par IRM chez des sujets de masse semblable et à jeun entre 14 et 15 heures [Petersen et al., 1996; Rothman et al., 1991] et, en utilisant les concentrations de glycogène hépatique rapportées par Nilsson et Hultman [1973], la contribution de la néoglucogénèse serait d'environ 47 à 56 %; ce qui est compatible avec les résultats rapportés avec la ¹³C-RMN et l'²H₂O.

En utilisant MIDA lors d'une infusion de [U-¹³C₃]-glycérol, Hellerstein [1997] et Siler et al. [1998] ont rapporté qu'environ 30 à 39 % de la production hépatique de glucose mesurée chez des sujets à jeun entre 12 et 14 heures provenaient de la néoglucogénèse. Après 60 à 64 heures de jeûne, la contribution relative de la

néoglucogénèse mesurée à l'aide de cette même méthode était de 80 % [Hellerstein, 1997]. Dans l'ensemble, ces valeurs, sont de 15 à 30 % plus basses que celles obtenues avec la ^{13}C -RMN, $^2\text{H}_2\text{O}$ et la biopsie à l'aiguille. Étant donné que des études menées *in vitro* chez le Rat [Previs et al., 1998; Previs et al., 1995] et *in vivo* chez l'Homme [Landau et al., 1995a] et le macaque [Previs et al., 1995] ont montré que MIDA pouvait mener à une sous-estimation de la contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose, il est plausible que les valeurs rapportées par Hellerstein [1997] et Siler et al. [1998] soient en effet sous-estimées.

Quant à la contribution de la néoglucogénèse mesurée à l'aide de la différence artérioveineuse hépatique des trois principaux précurseurs glucoformateurs (lactate, alanine, glycérol), elle est en moyenne de 25 et 88 % après 12-14 heures et 60 heures de jeûne respectivement (Tableau 3). Ces données suggèrent que la différence artérioveineuse sous-estime plus la contribution réelle de la néoglucogénèse après des jeûnes courts que des jeûnes longs.

Dans l'ensemble, les résultats récents obtenus à l'aide des techniques développées dans le laboratoire de Shulman [Rothman et al., 1991] et de Landau [Landau et al., 1996; Landau et al., 1995b] mettent en évidence que contrairement aux hypothèses initiales [Chiasson et al., 1977; Wasserman et al., 1993], le foie a une activité néoglucogénique relativement élevée, même à l'état post prandial immédiat. Ces données sont compatibles avec le fait que la contribution de la voie indirecte à la synthèse de glycogène dans le foie se situe entre 23 et 50 % [Magnusson et al., 1989; Magnusson et al., 1987; Radziuk, 1989; Radziuk, 1989a; Radziuk, 1982a; Shulman et al., 1991]. Ainsi, pendant les 12 heures suivant un repas, la contribution relative de la néoglucogénèse serait d'environ 50 %. Entre 12 et 24 heures de jeûne, sa contribution serait d'environ 60 %. Finalement après 40 à 60 heures de jeûne, elle atteindrait environ 95 %. Par contre, en terme absolu, le flux néoglucogénique est assez constant (5 à 6 $\mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) puisque la production hépatique de glucose diminue progressivement au cours du jeûne. En effet, après 12, 24 et 60 heures de jeûne, la production hépatique de glucose se situe respectivement entre 10-12, 8-9 et 5-9 $\mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

Ces récentes données obtenues chez l'humain sont compatibles avec celles obtenues chez le Rat [Neese et al., 1995; Péroni et al., 1997; Péroni et al., 1995; Podolin et al., 1999; Previs et al., 1995]. En effet chez des rats à jeun entre 12 et 14 heures, la contribution de la néoglucogénèse a été évaluée entre 52 et 56 % [Péroni et al., 1997; Péroni et al., 1995; Podolin et al., 1999] et entre 90 et 100% après 48 heures de jeûne % [Péroni et al., 1997; Péroni et al., 1995; Previs et al., 1995]. Péroni et al. [1997] et Neese et al. [1995] ont rapporté que l'augmentation de la contribution relative de la néoglucogénèse était en grande partie due à une importante baisse du flux glycogénolytique plutôt qu'à une augmentation du flux néoglucogénique (Figure 18). Péroni et al. [1997] ont en effet rapporté des flux néoglucogéniques de 3,7 et 4,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{g}^{-1}$ après 12 et 48 heures de jeûne respectivement. Neese et al. [1995] ont, quant à eux, trouvé des flux néoglucogéniques entre 3,3 et 3,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{g}^{-1}$ après 5 à 6, 10 à 11 et 20 à 24 heures de jeûne.

3.1.2 Contribution des différents précurseurs

Bien qu'aucune méthode ne permette de réellement déterminer quelle est la contribution individuelle de chacun des précurseurs glucoformateurs, il est néanmoins possible de connaître avec suffisamment de précision la contribution du glycérol et du PEP, les deux précurseurs immédiats du glucose. Les méthodes permettant de déterminer le flux néoglucogénique à partir du PEP ont été présentées dans la section 2 du chapitre 1 (2.1.4, 2.2.2, 2.2.3, 2.2.5, 2.3.2). De toutes ces techniques, la biopsie chimique au phényl-acétate avec le $[3-^{13}\text{C}_1]$ -lactate semble être celle qui est la plus juste pour une utilisation *in vivo*. Le rapport C6/C2 de l'enrichissement en deutérium du glucose lorsque de $\text{l}^2\text{H}_2\text{O}$ est ingérée peut également être utilisé si on suppose une sous-estimation systématique d'environ 20 % [Landau et al., 1995b].

Deux études ont utilisé la biopsie chimique au phényl-acétate et l'infusion de $[3-^{13}\text{C}_1]$ -lactate *in vivo* chez l'Homme [Diraison et al., 1998; Landau et al., 1995]. Ces auteurs ont rapporté que la contribution de la néoglucogénèse à partir du PEP à la

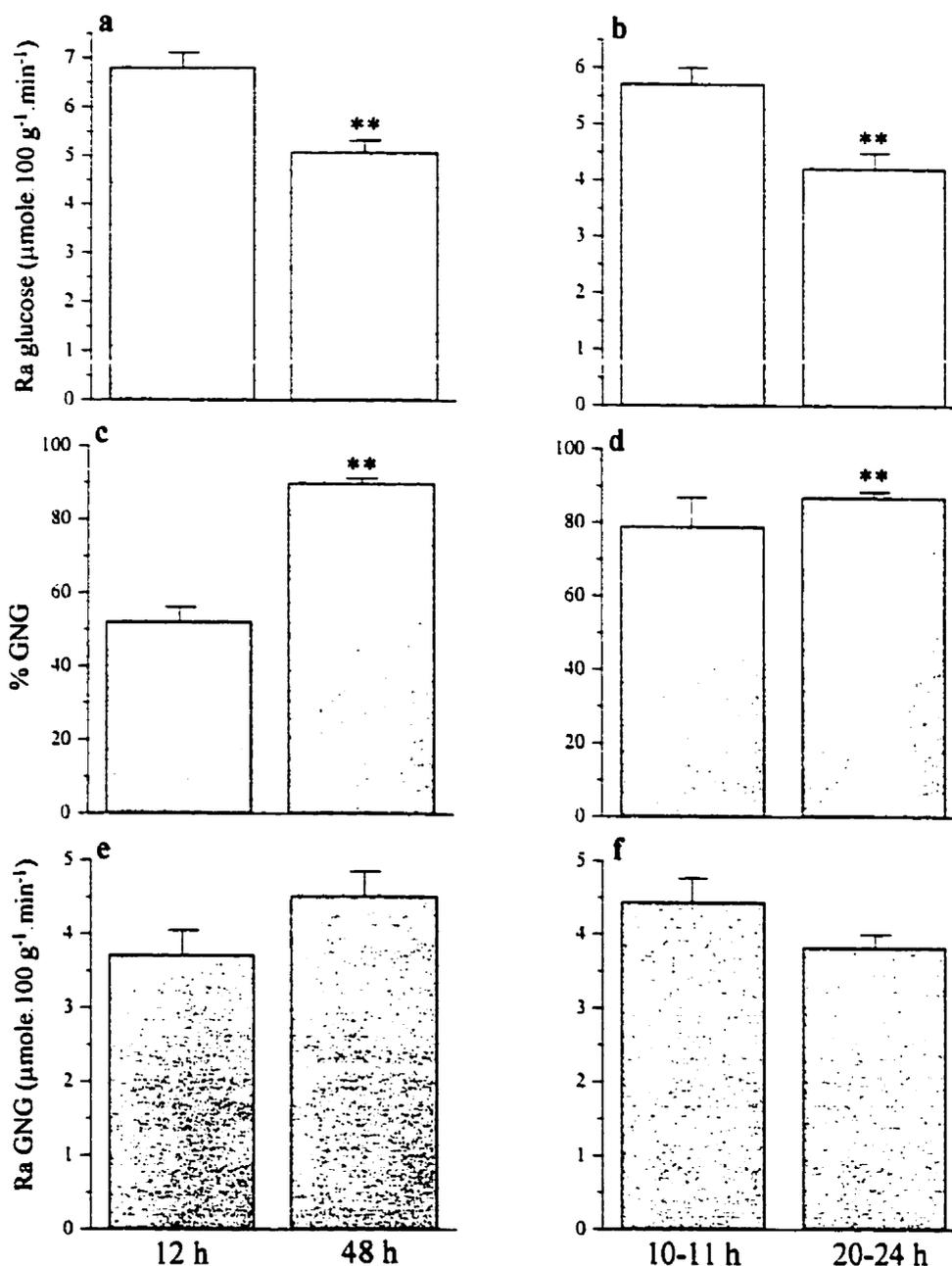


Figure 18: Production hépatique de glucose et contribution de la néoglucogénèse chez le Rat à jeun. Les données sont tirées de l'article de Péroni et al. [1997] (Figures a, c, e), et Neese et al [1992] (Figures b, d, f). Dans ces deux études, MIDA lors d'une infusion de $[2 -^{13}\text{C}_1]$ -glycérol a été utilisée pour mesurer la contribution relative de la néoglucogénèse (% GNG). La production hépatique de glucose (R_a glucose) a été mesurée par une technique isotopique standard avec du $[3-^3\text{H}]$ -glucose ou du $[6-^3\text{H}]$ -glucose. La contribution absolue de la néoglucogénèse (R_a GNG) a été obtenue en multipliant le R_a glucose par la contribution relative de la néoglucogénèse.

production hépatique de glucose était de 41 et 86 % chez des sujets à jeun de 12 heures [Diraison et al., 1998] et de 60 heures [Landau et al., 1995] respectivement. Si un facteur de correction de 20 % est appliqué aux données obtenues à l'aide du rapport C6/C2 dans les études utilisant l' $^2\text{H}_2\text{O}$ [Landau et al., 1995b], des valeurs similaires sont obtenues (42 % chez des sujets à jeun entre 14 et 16 heures et 80 % entre 60 et 70 heures de jeûne). En effet, Landau et al. [1995b] ont rapporté une contribution relative du PEP à la production hépatique de glucose de 34 % après un jeûne entre 14 et 16 heures et 64 % entre 60 et 70 heures.

Quant à la contribution de la néoglucogénèse à partir du glycérol, elle peut être estimée en faisant la différence entre le flux néoglucogénique total (Tableau 2) et le flux néoglucogénique à partir du PEP. Cette valeur est de 8 % après un jeûne entre 12 et 14 heures et de 11 % après 60 heures.

.3.2 Contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose à l'exercice

Étant donné que la néoglucogénèse est une voie métabolique dont il est difficile de quantifier avec précision le flux *in vivo*, l'ensemble des techniques récentes mises au point pour mesurer sa contribution à la production hépatique de glucose ont été utilisées dans des conditions expérimentales idéales; c'est à dire au repos et dans plusieurs cas après un jeûne prolongé (60 heures chez l'humain et 48 heures chez le Rat) de façon à s'assurer que la contribution théorique de la néoglucogénèse soit proche de 100 %. Par conséquent, les données disponibles chez l'Homme à l'exercice sont peu nombreuses et ont été obtenues dans la plupart des cas avec des techniques reconnues pour sous-estimer la néoglucogénèse au repos: différence artérioveineuse [Ahlborg et Björkman, 1990; Ahlborg et al., 1986; Ahlborg et Felig, 1982; Ahlborg et Felig, 1977; Ahlborg et al., 1974; Björkman and Eriksson., 1983; Björkman et al., 1981; Sestoft et al., 1977; Wahren et al., 1975; Wahren et al., 1971], infusion de $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ [Coggan et al., 1995] et de précurseurs marqués [Bergman et al., 2000; Lavoie et al., 1997; Stanley et al., 1988]. Récemment, la technique MIDA lors d'une infusion de $[2\text{-}^{13}\text{C}_1]\text{-glycérol}$ ou de $[3\text{-}^{13}\text{C}_1]\text{-alanine}$ a également été utilisée par le laboratoire de Brooks pour mesurer le flux de la

néoglucogénèse à l'exercice [Trimmer et al., 1998]. Cependant ces données, publiées sous forme de résumé, ont été obtenues chez un seul sujet et cette méthode a été sévèrement critiquée [Landau et al., 1995a; Previs et al., 1999; Previs et al., 1998; Previs et al., 1995].

Les études menées chez le Chien et le Rat à l'exercice présentent les mêmes problèmes que les études effectuées chez l'Homme. Les techniques qui ont été utilisées sont la différence artério-veineuse et/ou l'infusion de précurseurs marqués [Wasserman et al., 1993; Wasserman et al., 1990; Wasserman, et al., 1988], l'infusion de bicarbonates marqués [Ryan et al., 1993] ainsi que la combinaison de traceurs réversibles et irréversibles du glucose [Brooks and Donovan, 1983; Donovan and Sumida, 1990; Turcotte et Brooks, 1990; Turcotte et al., 1990].

Par ailleurs, il existe un certain nombre d'études chez l'Homme [Hultman et Nilsson, 1971], le Chien [Wasserman et al., 1988] et le Rat [Donovan and Sumida, 1990; Ryan et al. 1993; Sonne et al., 1987; Sonne et Galbo, 1986; Sonne et al., 1985a; Vissing et al., 1989; Vissing et al., 1988; Vissing et al., 1988a] dans lesquelles des prélèvements de tissus hépatiques ont été obtenus avant et après l'exercice, permettant ainsi de calculer le flux glycogénolytique moyen durant l'effort. Dans toutes ces études sauf celle d'Hultman et Nilsson [1971], la production hépatique de glucose a été mesurée, permettant de calculer le flux néoglucogénique moyen au cours de l'exercice.

Dans cette section, les données permettant de dresser un portrait de la réponse du métabolisme hépatique du glucose à l'exercice sont revues de façon distincte chez l'Homme, le Chien et le Rat. Il semble exister entre ces espèces certaines différences qu'il paraît intéressant de considérer avant d'aborder, dans la section 4, les effets de l'entraînement en endurance sur la réponse hépatique à l'exercice.

3.2.1 Métabolisme hépatique du glucose à l'exercice chez l'Homme

3.2.1.1 *Production hépatique de glucose*

Pour un exercice prolongé effectué à puissance constante, la production hépatique de glucose varie en fonction de la durée de l'effort [Kjær, 1995]. La figure 19 présente des cinétiques de production hépatique de glucose au cours d'exercices prolongés de 90 à 120 minutes effectués à puissance constante après 12 à 14 heures de jeûne chez l'Homme [Coggan et al., 1995; McConell et al., 1994; Mendenhall et al., 1994; Phillips et al., 1996; Phillips et al., 1995]. Ces études rapportent de façon générale une augmentation progressive de la production hépatique de glucose au cours de l'effort et ce jusqu'à 120 minutes. Un nombre restreint de données sont disponibles concernant la production hépatique de glucose pour des exercices d'une durée supérieure à 120 minutes chez des sujets à jeun entre 12 et 14 heures [Ahlborg et Felig, 1982; Ahlborg et Felig, 1977; Ahlborg et al., 1974; Stein et al., 1989]. Ces études montrent que la production hépatique de glucose plafonne, puis diminue lorsque l'exercice se prolonge (Figure 20). En effet, lors d'un exercice de 4 heures effectué à 30 % du $VO_2\text{max}$, une baisse de 25 % (de 25,3 à 19,2 $\mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) de la production hépatique de glucose a été observée durant la dernière heure de l'exercice [Ahlborg et Felig, 1977; Ahlborg et al., 1974]. Pour un exercice de 3 heures effectué à une intensité supérieure, soit à 60 % du $VO_2\text{max}$, Ahlborg et Felig [1982] ont observé une baisse de 62 % de la production hépatique de glucose (de 41,1 à 15,8 $\mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) durant la dernière heure de l'exercice. Stein et al. [1989] ont également observé une diminution de 50 % de la production hépatique de glucose entre la 4^{ème} et la 6^{ème} heure d'un exercice effectué à environ 55 % du $VO_2\text{max}$. Cependant, il est à noter que les valeurs rapportées par Stein et al. [1989] sont beaucoup trop élevées pour un exercice de cette intensité et de cette durée, ce qui suggère une erreur de nature méthodologique. Néanmoins, les données rapportées dans cette étude indiquent que la production hépatique de glucose plafonne et diminue lors d'un exercice de très longue durée.

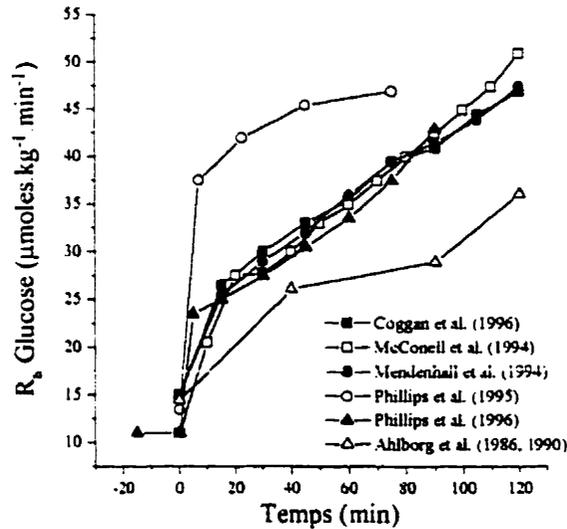


Figure 19: Production hépatique de glucose chez l'Homme au cours d'un exercice de moins de 120 minutes. Dans les études de Ahlborg et al. [1986] et Ahlborg et Eriksson [1990], l'exercice était effectué à 30 % du $VO_{2,max}$ (1,17 L/min), alors que dans l'ensemble des autres études, la puissance relative utilisée était de 59-69 % du $VO_{2,max}$ (2,1 - 2,2 L/min). Dans toutes les études sauf celles de Ahlborg et al. [1986] et Ahlborg et Eriksson [1990], dans lesquelles la différence artériovoineuse hépatique a été utilisée, la production hépatique de glucose a été mesurée à l'aide d'une technique isotopique standard.

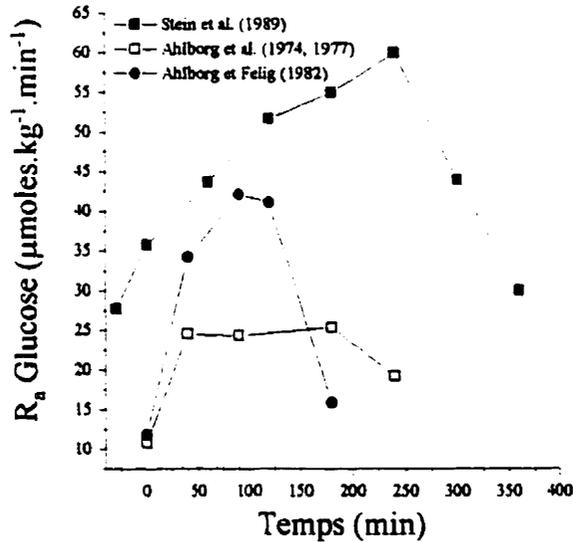


Figure 20: Production hépatique de glucose chez l'Homme au cours d'un exercice de plus de 120 minutes. Dans ces études, la puissance à laquelle a été effectué l'exercice correspondait à 30, 58 et 53 % du $VO_{2,max}$ respectivement, soit 1,26, 2,2 et 2,2 L/min. Dans les études du groupe de Ahlborg, la production hépatique de glucose a été déterminée par différence artériovoineuse hépatique, alors que dans l'étude de Stein et al. [1989], une technique isotopique standard a été utilisée.

Outre la durée de l'effort, la production hépatique de glucose est également dépendante de l'intensité à laquelle l'exercice est effectué [Kjær, 1995]. La figure 21, extraite de la méta-analyse de Kjær sur le métabolisme hépatique à l'exercice [Kjær, 1995], montre la relation entre la production hépatique de glucose et la puissance de l'exercice chez l'Homme à jeun entre 12 et 14 heures. La relation a été établie à partir des données provenant de 23 études qui ont mesuré la production hépatique de glucose soit par différence artérioveineuse hépatique ou par une technique isotopique standard avec du ^2H -glucose. La production hépatique de glucose au repos (environ $11 \mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) représente la valeur moyenne obtenue chez 84 sujets et, chaque point sur le graphique représente une moyenne de 5 et 10 sujets. Cette figure montre que l'augmentation de la production hépatique de glucose en réponse à l'exercice est linéaire pour des puissances d'exercices allant jusqu'à ~60 % du VO_2max , après quoi l'augmentation tend à être exponentielle. Pour des exercices de faible puissance (entre 40 et 50 % du VO_2max), la production hépatique de glucose est de l'ordre de 20 à $30 \mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Pour une puissance moyenne à élevée (entre 60 et 80 % du VO_2max), la production hépatique de glucose est de l'ordre de 40 à $60 \mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, alors que pour des exercices de puissance élevée (entre 100 et 110 % du VO_2max) et de courte durée, des taux d'apparition du glucose circulant allant de pouvant atteindre des valeurs comprises entre 70 et $120 \mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ont été rapportés [Kjær et al., 1986; Marliss et al. 1992].

.3.2.1.2 Contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse

Les résultats de l'étude de Hultman et Nilsson [1971], obtenues à l'aide de la biopsie hépatique à l'aiguille, suggèrent que durant la première heure d'un exercice d'intensité moyenne à élevée (75 % du VO_2max), l'accroissement de la production hépatique de glucose est principalement due à une augmentation du flux glycogénolytique, tandis que l'accroissement du flux néoglucogénique est proportionnellement beaucoup plus faible. Dans cette étude [Hultman et Nilsson, 1971], la concentration de glycogène pré- et post-exercice était de 44 et 20 g/kg de tissu respectivement (Figure 22). La quantité totale de glycogène dégradée au cours de l'exercice était donc d'environ 36 g, sachant que le volume hépatique est d'environ 1,5

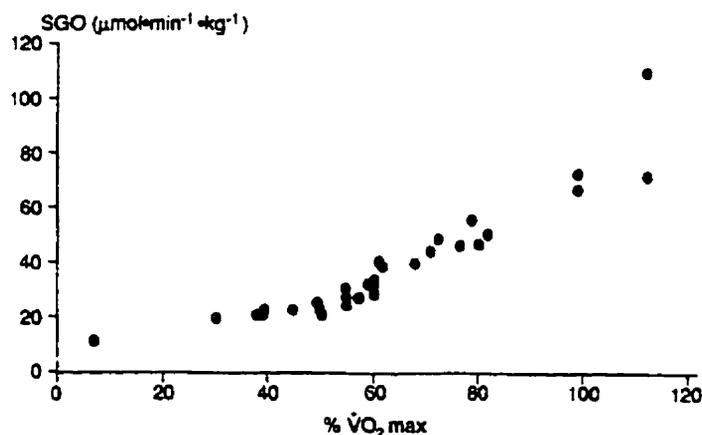


Figure 21: Production hépatique de glucose au repos et à l'exercice en fonction de puissance relative (% $\dot{V}O_2$ max). La figure est tirée de la revue de Kjaer (1995) sur le métabolisme hépatique à l'exercice. Les données présentées constituent une valeur moyenne pour 84 sujets au repos et à l'exercice (course ou bicyclette). Chaque point représente la moyenne d'environ 5-10 sujets. Dans l'ensemble des études, la production hépatique de glucose a été mesurée par différence artério-veineuse hépatique ou à l'aide d'une technique isotopique standard.

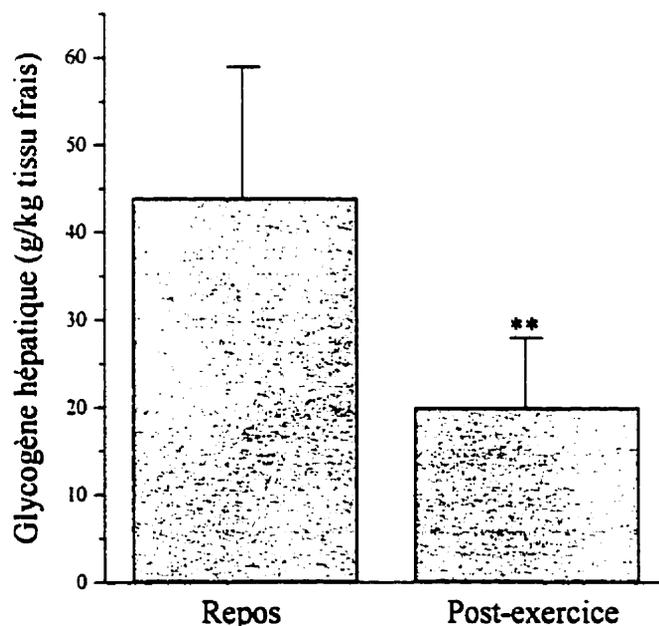


Figure 22: Variation de la concentration de glycogène hépatique chez l'Homme en réponse à un exercice d'une heure à 75 % du $\dot{V}O_2$ max. La figure est extraite de l'étude de Hultman et Nilsson [1971]. La concentration de glycogène a été mesurée à partir d'échantillons prélevés par biopsie hépatique à l'aiguille chez 33 sujets au repos et 14 sujets ayant effectué un exercice de 60 min à 75 % du $\dot{V}O_2$ max après 12-14 h de jeûne. Le prélèvement de tissu a été effectué à la même heure de la journée chez les sujets maintenus au repos ou soumis à l'exercice. **: différent du repos, $P \leq 0,001$.

L (et non de 1,8 L, tel qu'utilisé par les auteurs) chez des sujets de 70 à 80 kg [Petersen et al., 1996]. Pour un effort de cette puissance (75 % du VO_2max), la production hépatique de glucose est en moyenne de 40 à 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (Figure 21), soit une production totale de 31 à 41 g de glucose pour les 60 minutes d'exercice. Dans ces conditions expérimentales, la contribution moyenne de la néoglucogénèse était donc au minimum de 0 g et au maximum de 5 g, soit 0 à 13 % de la production hépatique de glucose, alors que la contribution moyenne de la glycogénolyse était de 100 à 87 %.

Les résultats de Wahren et al. [1971] et Björkman et Eriksson [1983], obtenus par différence artério-veineuse hépatique chez des sujets à jeun entre 12 et 14 heures, suggèrent également que durant la première heure d'exercice, la hausse du flux glycogénolytique est en grande partie responsable de la hausse de la production hépatique de glucose (Tableau 4). Dans l'étude de Wahren et al. [1971], la contribution de la néoglucogénèse à partir du lactate, du pyruvate et du glycérol a été mesurée lors d'un exercice de 40 minutes effectué à trois intensités différentes (65, 131 et 196 W). À la 40^{ème} minute de l'exercice effectué à 196 W, puissance proche de celle utilisée dans l'étude de Hultman et Nilsson [1971], le flux glycogénolytique était 437 % supérieur à la valeur de repos, alors que le flux néoglucogénique était seulement 23 % plus élevée. Globalement, la contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose était de 88 et 12 % respectivement. Ces résultats sont en accord avec les résultats rapportés par Hultman et Nilsson [1971], qui sont de 87 et 13 % pour la glycogénolyse et la néoglucogénèse respectivement. Pour les deux exercices à plus faible puissance (65 et 131 W), l'augmentation de la production hépatique de glucose, quoique moindre, était également due à une stimulation de la glycogénolyse, et d'une manière beaucoup moins importante, à une stimulation de la néoglucogénèse. Les résultats rapportés par Björkman et Eriksson [1983], pour un exercice effectué entre 55 et 60 % du VO_2max , sont également compatibles avec ceux rapportés par Wahren et al. [1971]. La contribution moyenne de la néoglucogénèse est cependant légèrement plus élevée dans l'étude de Björkman et Eriksson [1983] (19 % vs 12 à 15 % de la production hépatique de glucose). Ceci est probablement dû au fait que dans cette étude, la contribution des quatre principaux précurseurs glucoformateurs

Tableau 4 : Production hépatique de glucose et contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse au cours de l'exercice de moins de 60 minutes chez l'Homme.

Référence	Protocole	Temps (min)	R _a glucose ($\mu\text{moles.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	GNG totale		Glycogénolyse	
				($\mu\text{moles.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%R _a glu)	($\mu\text{moles.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%R _a glu)
Wahren et al. [1971]	jeun 12-14 h 40 min ergo 400 kpm (1 L/min)	0	10,5	1,6	15	8,9	85
		5	15,9	0,4	3	15,5	97
		10	12,9	3,3	25	9,7	75
		20	19,4	3,9	20	15,5	80
		30	18,6	1,7	8	17,1	92
		40	21,5	3,9	19	17,6	81
		ASC	9,45 g	1,44 g	15 %	8,0 g	85 %
	jeun 12-14 h 40 min ergo 800 kpm (1,7 L/min)	0	10,8	1,7	16	9,1	84
		5	11,8	3,2	27	8,7	73
		10	16,1	4,1	25	12,1	75
		20	27,2	3,4	13	23,8	87
		30	27,1	2,1	8	25,1	92
		40	29,3	2,6	9	26,7	91
		ASC	12,3 g	1,6 g	13 %	10,7 g	87 %
	jeun 12-14 h 40 min ergo 1200 kpm (2,3 L/min)	0	10,6	1,9	18	8,7	82
		5	18,6	8,7	46	10,0	54
		10	25,7	4,5	18	21,2	82
		20	34,1	3,3	10	30,9	90
		30	46,7	3,0	6	43,8	94
		40	49,3	2,33	5	47,0	95
		ASC	18,7 g	2,1 g	11 %	16,6 g	89 %

Référence	Protocole	Temps (min)	R _a glucose ($\mu\text{moles}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	GNG totale		Glycogénolyse	
				($\mu\text{moles}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	(%R _a glu)	($\mu\text{moles}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	(%R _a glu)
Bjorkman et	jeun 12-14 h 40 min ergo 55-60 % VO ₂ max (2,3 L/min)	0	8,5	3,0	35	5,5	65
		20	27,1	4,9	18	22,3	82
		40	34,7	5,6	16	29,1	84
		ASC	12,8 g	2,4 g	19 %	10,4 g	81 %
Eriksson [1983]	jeun 60 h 40 min ergo 55-60 % VO ₂ max (1,9 L/min)	0	4,4	4,0	92	0,4	8
		20	9,1	11,8	100	0	0
		40	13,0	10,8	83	2,4	17
		ASC	4,2 g	4,6 g	100 %	0 g	0 %

(lactate, pyruvate, glycérol et alanine) a été mesurée, alors que dans l'étude de Wahren et al. [1971] la contribution de l'alanine n'a pas été déterminée.

Bien qu'aucune mesure directe de la variation de la concentration de glycogène n'a été effectuée lors d'exercices poursuivis au-delà de 60 minutes, les données de Hultman et Nilsson [1971] suggèrent néanmoins que le flux glycolytique observé durant la première heure d'exercice pourrait être maintenu durant la deuxième heure, après quoi un épuisement complet des réserves de glycogène serait observé. Le tableau 5 et les figures 23 et 24 présentent les données obtenues par le groupe de Ahlborg à l'aide de la différence artério-veineuse hépatique [Ahlborg et Björkman, 1990; Ahlborg et al., 1986; Ahlborg et Felig, 1982; Ahlborg et Felig, 1977; Ahlborg et al., 1974], ainsi que par Coggan et al. [1995] à l'aide d'une infusion de $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$. Pour les trois études dans lesquelles la durée de l'exercice était de 120 minutes à une puissance comprise entre 30 et 60 % du VO_2max [Ahlborg et Björkman, 1990; Ahlborg et al., 1986; Coggan et al., 1995], la quantité totale de glucose produite était inférieure ou proche de la quantité de glycogène hépatique disponible (entre 50 et 72 g) chez des sujets à jeun entre 12 et 14 heures, qui a été rapportée dans les études de Petersen et al. [1996] et de Rothman et al. [1992]. Dans ces études, une augmentation linéaire du flux glycolytique et de la production hépatique de glucose a été observée au cours de l'effort. Cependant, dans les études où l'exercice était d'une durée de 180 et 240 minutes à une puissance de 60 et 30 % du VO_2max respectivement [Ahlborg et Felig, 1982; Ahlborg et Felig, 1977; Ahlborg et al., 1974], la quantité totale de glucose produite était proche ou supérieure à la quantité de glycogène disponible. Dans ces mêmes études, un plafonnement puis une diminution importante du flux glycolytique ont été observés durant la dernière heure d'exercice. Cette diminution n'a pu être compensée par l'accroissement du flux néoglucogénique ainsi, une importante baisse de la production hépatique de glucose a été observée. En effet, bien que la contribution relative de la néoglucogénèse soit passée de 11 à 19 % à 39 à 48 % durant la dernière heure d'exercice, le flux néoglucogénique absolu ne s'est seulement accru de 2,6 à 2,9 $\mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, alors qu'il aurait fallu une augmentation comprise entre 6,1 et 25,3 $\mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ pour prévenir la chute de la production hépatique de glucose (Tableau 5).

Tableau 5: Production hépatique de glucose et contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse au cours de l'exercice prolongé chez l'Homme.

Référence	Protocole	Temps (min)	R _g glu ($\mu\text{moles}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	GNG totale		Glycogénolyse	
				($\mu\text{moles}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	(%R _g glu)	($\mu\text{moles}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	(%R _g glu)
Ahlborg et al. [1974,1977]	jeun 12-14 h 4 h ergo 30 % VO ₂ max (1,3 L/min)	0	10,8	2,6	24	8,2	76
		40	24,5	4,3	18	20,1	82
		80	24,3	2,8	12	21,5	88
		180	25,3	4,9	19	20,3	81
		240	19,2	7,5	39	11,7	61
		ASC	75,2 g	14,2 g	19 %	61,0 g	81 %
Ahlborg et al. [1986];	jeun 12-14 h 2 h ergo 30 % VO ₂ max (1,2 L/min)	0	14,5	2,2	15	12,3	85
40		26,1	3,6	14	22,5	86	
90		28,9	3,5	12	25,4	88	
120		36,1	3,7	10	32,4	90	
Bjorkman [1990]		ASC	42,1 g	5,3 g	13 %	36,8 g	87 %
Ahlborg et Felig [1982]	jeun 12-14 h 3-3,5 h ergo 58 % VO ₂ max (2,2 L/min)	0	11,3	1,5	13	9,8	87
		40	32,8	4,2	13	28,6	87
		90	40,4	4,5	11	35,9	89
		120	39,4	4,3	11	35,1	89
		180	15,2	7,2	48	7,9	52
		ASC	70,9 g	10,3 g	15 %	60,5 g	85 %

Référence	Protocole	Temps (min)	R _a glu ($\mu\text{moles.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	GNG totale		Glycogénolyse	
				($\mu\text{moles.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%R _a glu)	($\mu\text{moles.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	(%R _a glu)
Coggan et al. [1995]	jeun 12-14 h 2 h ergo 60 % VO ₂ max (2,1 L/min)	0	14,8	2,6	17	12,2	83
		15	27,0	4,5	17	22,4	83
		30	30,4	5,0	16	25,3	84
		45	33,5	6,0	18	27,4	82
		60	36,5	7,1	19	29,4	81
		75	39,2	8,1	21	31,0	79
		90	41,7	9,1	22	32,7	78
		105	44,3	10,1	23	34,2	77
		120	47,2	11,6	25	35,6	75
		ASC	65,8 g	13,3 g	27%	52,6 g	73 %

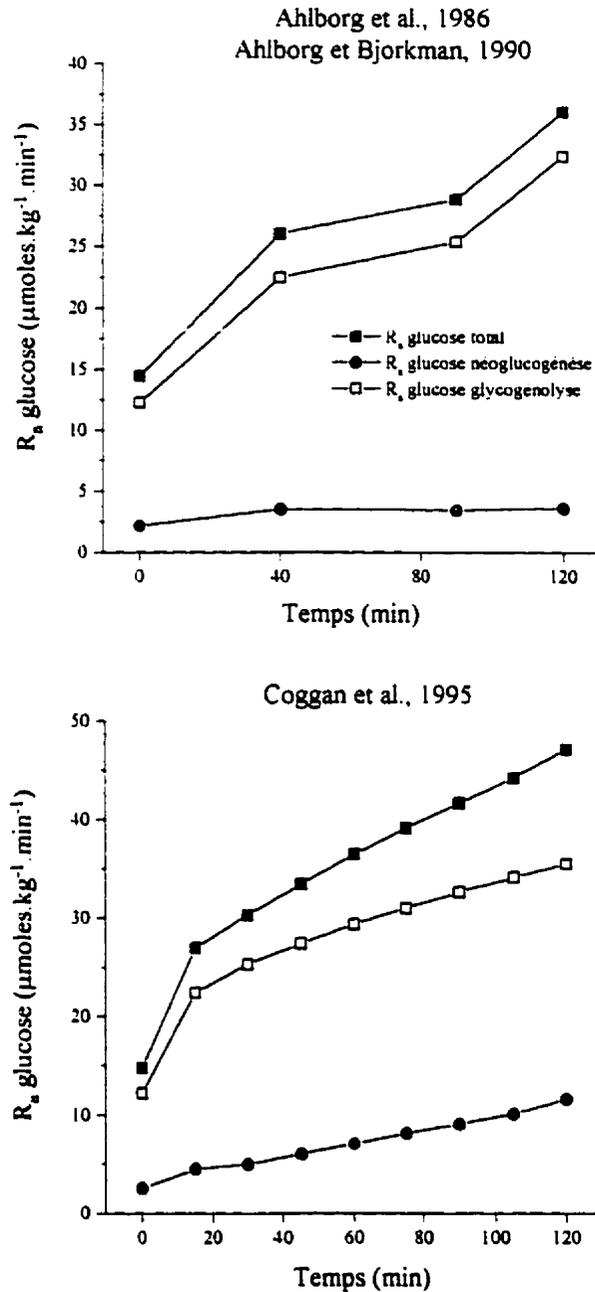


Figure 23: Production hépatique de glucose et contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse chez l'Homme au cours d'un exercice de moins de 120 minutes. Les figures résument les données rapportées dans l'étude de Ahlborg et al. [1986], qui ont été reprises par Ahlborg et Eriksson. [1990], ainsi que dans l'étude de Coggan et al. [1995]. Les données ainsi que la description des conditions expérimentales sont présentées dans le Tableau 5.

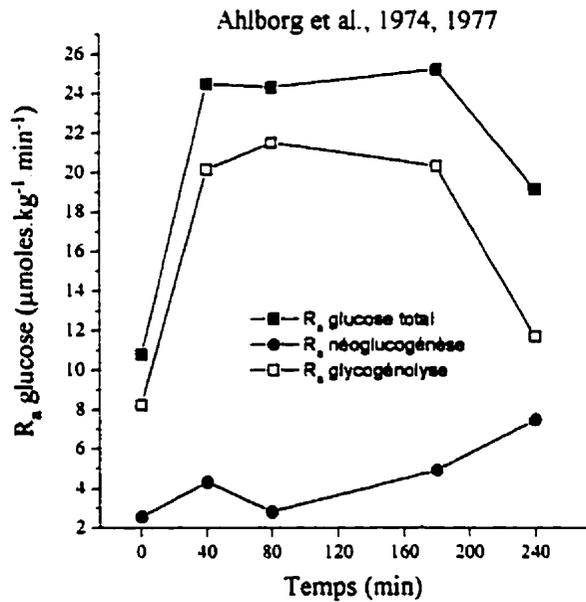
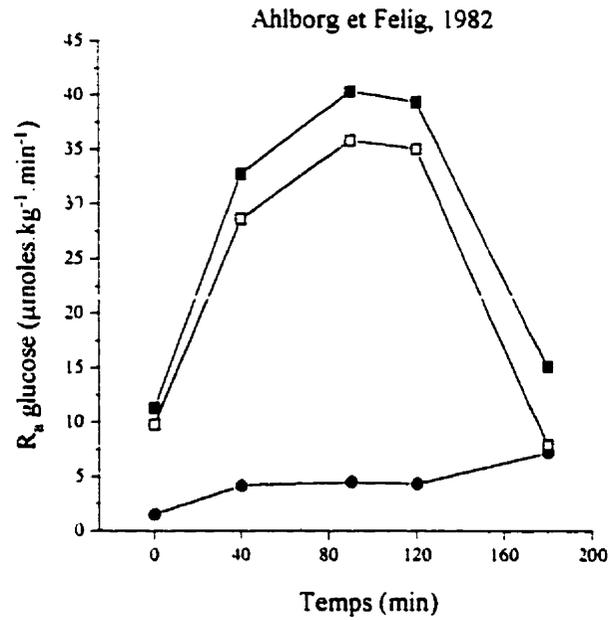


Figure 24: Production hépatique de glucose et contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse chez l'Homme au cours d'un exercice de plus de 120 minutes. Les deux figures résument les données rapportées par Ahlborg et al. [1974, 1977] et Ahlborg et Felig [1982]. Les données ainsi que la description des conditions expérimentales sont présentées dans le Tableau 5.

De façon générale, ces études suggèrent que chez l'Homme, la chute de la production hépatique de glucose observée tardivement au cours de l'exercice est directement relié à l'épuisement des réserves de glycogène. Ces études montrent également que le flux de la néoglucogénèse augmente de façon lente et linéaire au cours du temps, mais que cette voie ne semble pas avoir la capacité d'accroître son flux suffisamment pour maintenir une production hépatique de glucose élevée. Les données obtenues par Björkman et Eriksson [1983] chez des sujets à jeun de 60 heures (Tableau 4) effectuant un exercice de 40 minutes à 60 % du VO_2 max supportent en effet l'idée que la néoglucogénèse a une faible capacité maximale chez l'Homme. Dans cette même étude, une augmentation linéaire de la production hépatique de glucose a été observée au cours de l'exercice. Cependant, cette production était d'environ 50 % inférieure aux valeurs obtenues chez les mêmes sujets à jeun entre 12 et 14 heures. Après un jeûne de 60 heures la contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose au repos et à l'exercice est de 100 %, si bien que la production hépatique de glucose rapportée au cours de l'exercice dans cette étude pourrait s'approcher de la capacité maximale de la néoglucogénèse.

.3.2.2 Métabolisme hépatique du glucose à l'exercice chez le Chien

.3.2.2.1 Production hépatique de glucose

Les données disponibles, qui proviennent principalement du groupe de Wasserman, indiquent que chez le Chien la réponse du métabolisme hépatique du glucose à l'exercice prolongé est à maints égards semblable à ce qui est observé chez l'Homme. Le tableau 6 présente les résultats de quatre études du groupe de Wasserman dans lesquelles la différence artério-porto-veineuse a été utilisée à l'exercice chez le Chien à jeun entre 12 et 14 heures [Berger et al., 1994; Wasserman et al., 1993; Wasserman et al., 1990; Wasserman et al., 1988]. Dans l'étude de Wasserman et al. [1988], le contenu en glycogène du foie a été mesuré, permettant ainsi d'estimer directement la contribution moyenne de la glycogénolyse et de calculer la contribution de la néoglucogénèse, d'une manière complémentaire à la différence artério-porto-veineuse. Dans l'ensemble, ces études sont basées sur le même protocole d'exercice,

Tableau 6: Production hépatique de glucose et contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse au cours de l'exercice prolongé chez le Chien.

Référence	ASC R _a gluc (g)	[glyc] (g init; fin)	Prise précurseurs* (g)	GNG		Glycogén	
				(g)	(%)	(g)	(%)
Berger et al. [1994]	18,7	N.D.	6,5	3,2	17	15,4	83
Wasserman et al. [1988]	23,0	35; 13	N.D.	1,0	4	22,0	96
Wasserman et al. [1990]	26,3	N.D.	6,8	3,4	13	23,0	87
Wasserman et al. [1993]	24,6	N.D.	7,5	3,7	15	21,0	85

ASC R_a gluc: aire sous la courbe de la production hépatique de glucose.

[glyc] : Concentration de glycogène hépatique initiale et finale.

*: Aire sous la courbe de la prise de lactate, d'alanine et de glycérol dans la veine porte et l'artère hépatique.

soit 150 minutes de tapis roulant à 100 m/min avec une pente de 12 %. La production totale de glucose au cours de l'exercice, rapportée dans ces études est entre 18 et 26 g. La figure 25 montre que, de manière similaire à ce qui est observé chez l'Homme, la production hépatique de glucose augmente progressivement au cours des 90 premières minutes d'exercice, après quoi un plafonnement est observé. De plus, cette figure illustre également qu'au repos comme à l'exercice, la production hépatique de glucose du Chien est du même ordre de grandeur que celle observée chez l'Homme.

.3.2.2.2 *Contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse*

La contribution respective de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse calculée à l'aide de la différence artérioporto-veineuse chez le Chien est proche de ce qui est observé chez l'Homme. En effet, durant les 150 minutes d'exercice, la contribution moyenne de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse rapportées chez le Chien est de l'ordre de 83 à 87 et de 13 à 17 % respectivement [Berger et al., 1994; Wasserman et al., 1993; Wasserman et al., 1990], comparativement aux valeurs obtenues chez l'Homme qui sont de l'ordre de 81 à 87 et de 13 à 19 % respectivement pour un exercice de 120 à 240 minutes [Ahlborg et Björkman, 1990; Ahlborg et al., 1986; Ahlborg et Felig, 1982; Ahlborg et Felig, 1977; Ahlborg et al., 1974]. Ces valeurs sont toutefois différentes de celles qui ont été calculées à partir de la variation du contenu en glycogène hépatique rapportée dans l'étude de Wasserman et al. [1988]. Dans cette étude une légère surestimation de la variation du contenu en glycogène pourrait expliquer la surestimation de la contribution de la glycogénolyse (96 %) et la sous-estimation de la contribution de la néoglucogénèse (4 %). En ce qui a trait à l'évolution du flux néoglucogénique au cours de l'exercice, la figure 25 montre que de manière similaire à ce qui est observé chez l'Homme, le flux de la néoglucogénèse augmente de façon linéaire passant de 2,6 à 2,9 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (entre 15 et 18 % du R_a glucose) au repos à 6,6 à 9,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (entre 18 et 20 % du R_a glucose) en fin d'exercice.

Dans les quatre études du groupe de Wasserman [Berger et al., 1994; Wasserman et al., 1993; Wasserman et al., 1990; Wasserman et al., 1988] une infusion d'alanine

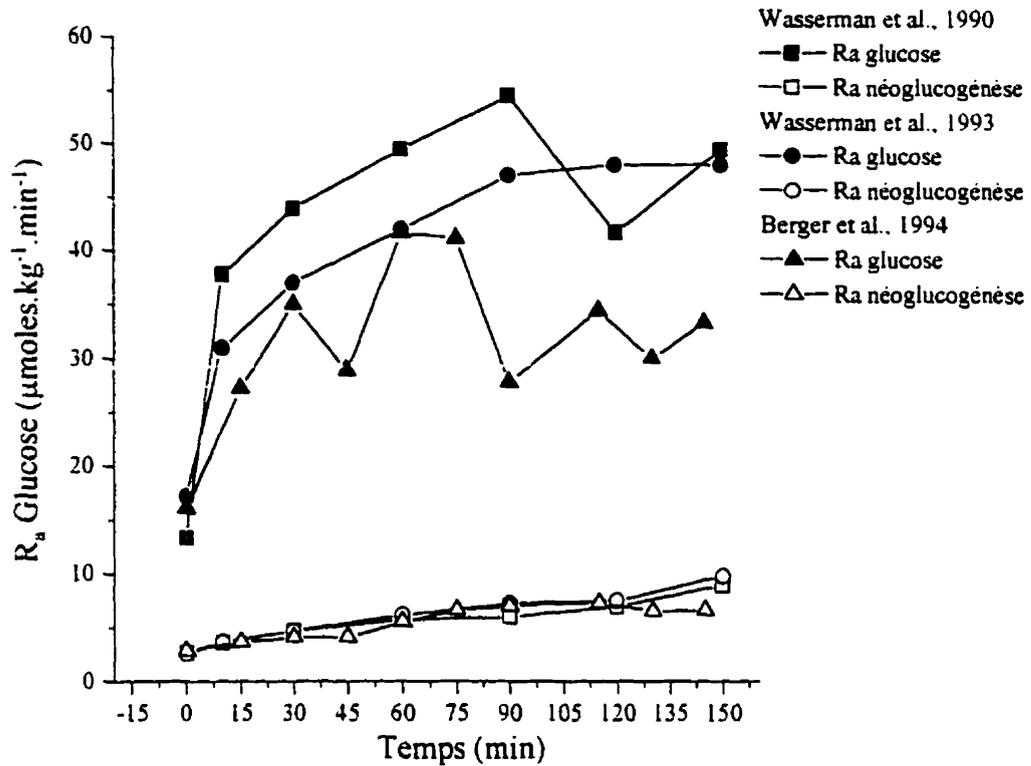


Figure 25: Production hépatique totale de glucose et contribution de la néoglucogénèse chez le Chien à l'exercice. Les données sont extraites de trois études du groupe de Wasserman [Wasserman et al., 1990, 1993; Berger et al., 1994] dans lesquelles la différence artérioporto-veineuse combinée à l'infusion de $[U-^{14}C_3]$ -alanine a été utilisée. La production hépatique de glucose (R_a glucose) et le flux néoglucogénétique (R_a néoglucogénèse) présentés sur cette figure ont été mesurés par différence artérioporto-veineuse en glucose, lactate, pyruvate, alanine et glycérol.

marquée a également été utilisée pour mesurer un index néoglucogénique. L'activité spécifique du glucose, du lactate et de l'alanine a été utilisée conjointement à la différence artério-porto-veineuse pour calculer la contribution «minimale» de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose. Comme il l'en a été discuté à la section 2.1.3, les valeurs obtenues à l'aide de cette approche dans des conditions de repos ne sont pas représentatives de la contribution réelle de la néoglucogénèse. Les données du groupe de Wasserman indiquent que cette sous-estimation persiste à l'exercice, ce qui suggère que les phénomènes d'échange et de dilution isotopique ne sont pas modifiés. En effet, au repos comme à l'exercice, la contribution moyenne de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose mesurée à l'aide des isotopes est de 2 à 6 fois inférieure à la valeur obtenue à l'aide de la différence artério-porto-veineuse (Tableau 7).

.3.2.3 Métabolisme hépatique du glucose à l'exercice chez le Rat

.3.2.3.1 Production hépatique de glucose

Chez le Rat, la réponse de la production hépatique de glucose au cours de l'exercice prolongé effectué à puissance constante est relativement similaire à ce qui est observé chez l'Homme et le Chien. La figure 26 présente la production hépatique de glucose observée dans différentes études au cours de l'exercice chez le Rat nourri et à jeun [Donovan et Sumida, 1990; Ryan et al., 1993; Sonne et al., 1987; Sonne et Galbo, 1986; Sonne et al., 1985a; Vissing et al., 1989; Vissing et al., 1988; Vissing et al., 1988a]. Chez le Rat nourri, les études du groupe de Galbo [Sonne et al., 1985a; Sonne et al., 1987; Vissing et al., 1988; Vissing et al., 1988a; Vissing et al., 1989] montrent que lors d'un exercice sur tapis roulant (21 m/min, 0 % de pente) d'une durée de 40 minutes, la production hépatique de glucose passe de 8 à 10 $\mu\text{moles.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ au repos à 13 à 17 $\mu\text{moles.100 g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ après environ 10 minutes d'exercice, cette valeur demeurant relativement constante par la suite. Pour un exercice de puissance et de durée identique, une augmentation rapide de la production hépatique de glucose est également observée chez le Rat à jeun de 12 à 48 heures [Donovan et Sumida, 1990; Sonne et al., 1987; Sonne et Galbo, 1986]. Cependant, la production hépatique de glucose atteinte à

Tableau 7: Contribution de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose chez le Chien au repos et à l'exercice: Comparaison de la différence porto-veineuse hépatique et de l'infusion de précurseurs marqués.

Référence	Condition	$\Delta a-v$ porto-veineuse	(RSA gluc / RSA préc) X A
		(% R _a glucose) A	(% R _a glucose) B
Berger et al. [1994]	Repos	17,9	3,8
	Exercice	17,4	7,6
Wasserman et al. [1990]	Repos	20,3	3,4
	Exercice	12,9	7,2
Wasserman et al. [1993]	Repos	15,1	3,5
	Exercice	15,1	9,2

RSA: Activité spécifique relative du glucose et des précurseurs glucoformateurs (lactate et alanine) dans le sang artériel à l'état stable lors d'une infusion de [U-¹⁴C₃]-alanine.

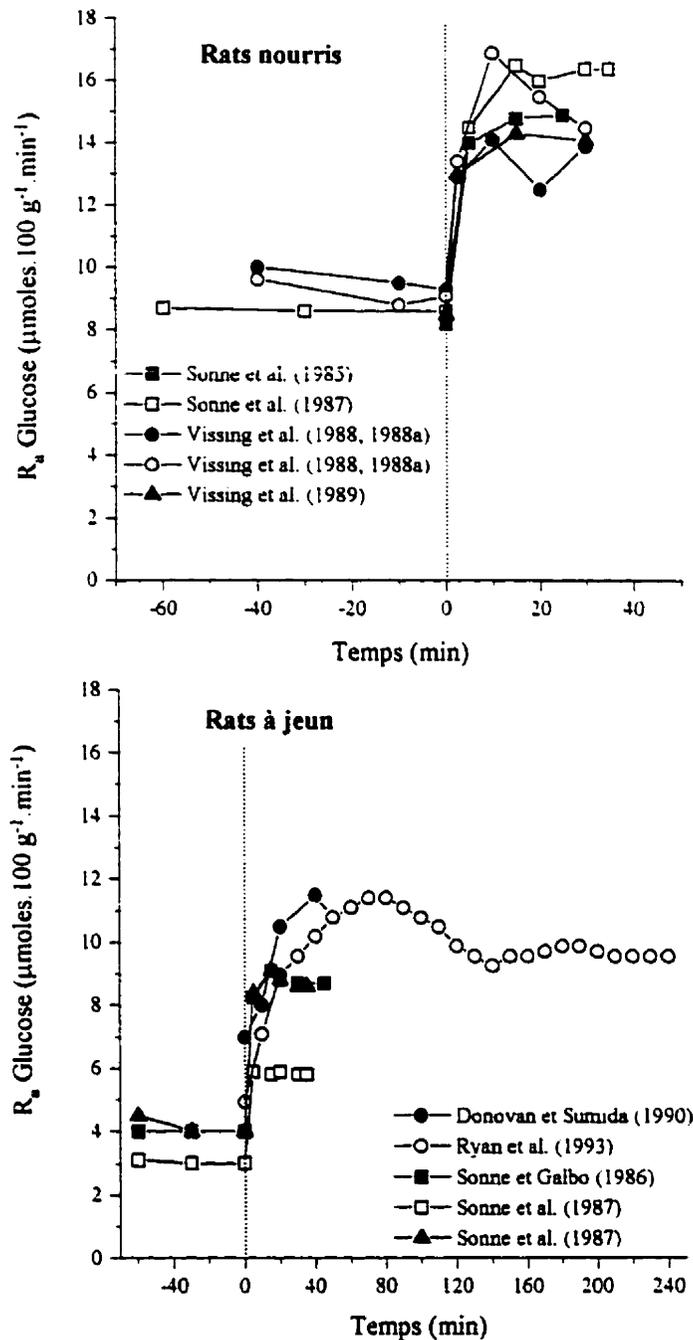


Figure 26: Taux d'apparition du glucose circulant au cours de l'exercice chez le Rat nourri et à jeun. Les deux figures résument les données publiées par Sonne et al. [1985, 1987] et Vissing et al. [1988, 1988a, 1989] chez le Rat nourri ainsi que par Donovan et Sumida [1990], Ryan et al. [1993], Sonne et Galbo [1986], et Sonne et al. [1987] chez le Rat à jeun. Dans l'étude de Donovan et Sumida [1990] et Ryan et al. [1993], le traceur utilisé était le $[6\text{-}^3\text{H}_1]$ -glucose, alors que dans les autres études, provenant toutes du groupe de Galbo, du $[3\text{-}^3\text{H}_1]$ -glucose a été utilisé. Toutefois, la position de l'hydrogène tritié sur le squelette carboné du glucose n'a peu ou pas d'influence sur les valeurs obtenues dans ces conditions.

l'état stable durant l'exercice chez le Rat à jeun est de l'ordre de 55 à 65 % inférieure à celle qui est observée chez le Rat nourri (6 à 10 vs 13 à 17 $\mu\text{moles} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Pour un exercice d'une durée supérieure à 60 minutes, les seules informations disponibles proviennent de l'étude de Ryan et al. [1993] qui ont mesuré la production hépatique de glucose et le flux néoglucogénique lors d'une séance de natation d'une durée de 4 heures chez le Rat à jeun de 12 heures. Ces auteurs ont rapporté une augmentation progressive de la production hépatique de glucose pendant les 80 premières minutes d'exercice, suivie d'une diminution graduelle et d'une stabilisation au cours des 160 dernières minutes.

Comme chez l'Homme, il existe chez le Rat une relation positive entre la puissance à laquelle l'exercice est effectué et la production hépatique de glucose. La figure 27, produite à partir des données de Brooks et Donovan [1983], montre en effet que le taux de renouvellement du glucose circulant augmente en fonction de la consommation d'oxygène chez des rats à jeun de 12 heures courant sur tapis roulant. Sonne et Galbo [1986; 1985] ont également observé une production hépatique de glucose inférieure chez des rats courant à 14 m/min, comparativement aux rats courant à 21 m/min (Figure 27).

.3.2.3.2 Contribution de la glycolyse et de la néoglucogénèse

Bien que la réponse du métabolisme hépatique à l'exercice chez le Rat et l'Homme soit apparemment similaire au niveau de la production totale de glucose, il semble néanmoins exister des différences entre ces deux espèces au niveau de la contribution de la glycolyse et de la néoglucogénèse. Une comparaison du rapport entre la quantité maximale de glycogène qui peut être emmagasinée dans le foie et la production totale de glucose au repos en 24 heures chez ces deux espèces, suggère que le Rat est beaucoup plus dépendant envers la néoglucogénèse que ne l'est l'Homme. Chez un Homme de 70 kg, le rapport quantité de glycogène / production totale de glucose est de l'ordre de 0,41 à 0,50, compte tenu que la quantité maximale de glycogène

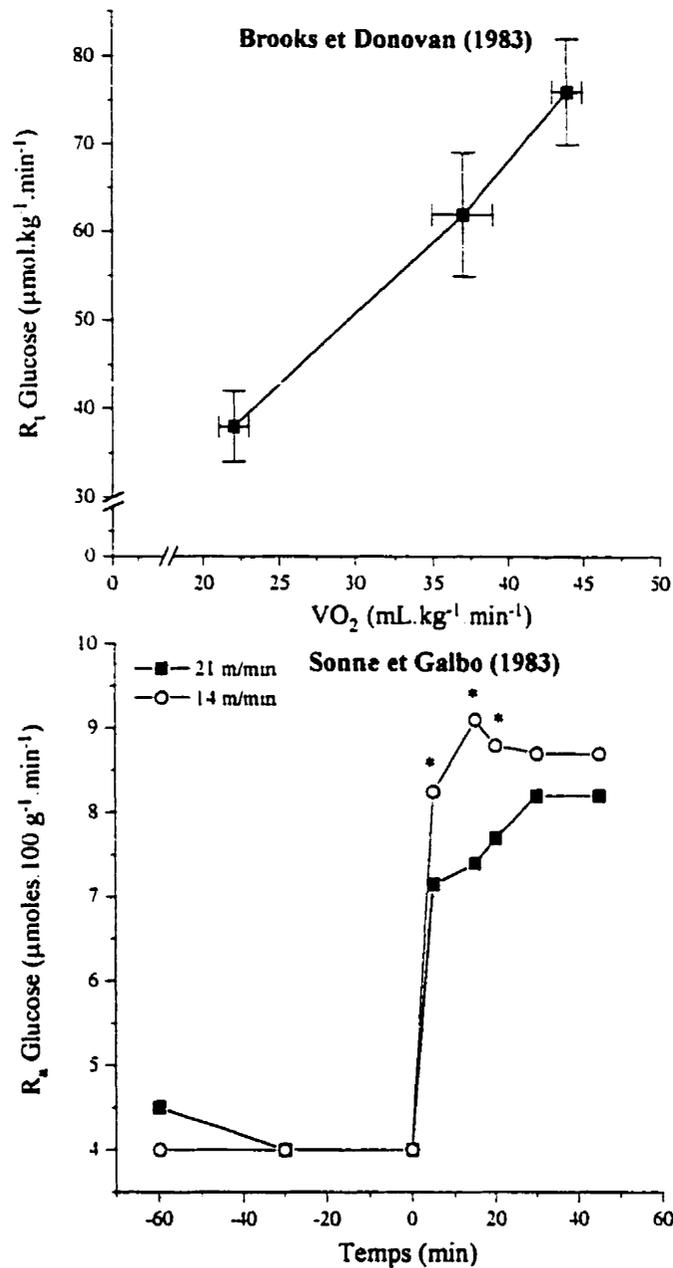


Figure 27: Relation entre la puissance d'exercice et le taux d'apparition du glucose circulant chez le Rat. La figure reproduite à partir des données de l'étude de Brooks et Donovan [1983] présente la relation entre le taux de renouvellement moyen du glucose circulant (R_1 glucose) et la consommation d'oxygène (VO_2) mesurée au repos et au cours d'un exercice sur tapis roulant (13.4 et 26.8 m/min, 1 % de pente) chez des rats à jeun de 12 h. Le R_1 glucose a été mesuré à l'aide d'une infusion continue de $[6-^3H]$ -glucose. La figure reproduite à partir des données de Sonne et Galbo [1986] présente l'évolution du taux d'apparition du glucose circulant (R_a glucose) au repos et au cours d'un exercice sur tapis roulant effectué à 14 ou 21 m/min à 0 % de pente chez des rats à jeun de 12 h. Dans cette étude, le R_a glucose a été déterminé à l'aide d'une infusion continue de $[3-^3H]$ -glucose. * : différent de 21 m/min, $P \leq 0,05$.

hépatique emmagasinée quelques heures après un repas est de l'ordre de 500 mmoles (90 g) [Petersen et al., 1996] et que la production hépatique de glucose au repos est de l'ordre de 10 à 12 $\mu\text{moles.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (Tableau 3). Chez un Rat de 200 g, ce rapport est environ sept fois plus bas, soit de l'ordre de 0,05 à 0,09. Ceci est attribuable au fait que la quantité de glycogène hépatique emmagasinée chez le Rat nourri n'est que de 1,44 à 2,00 mmoles ([glycogène] = 180 - 250 $\mu\text{moles/g}$ de poids frais; masse du foie = 4 % du poids corporel) [Sonne et al., 1987; Sonne et al., 1985; Vissing et al., 1989] et que le taux de renouvellement du glucose circulant au repos est dix fois plus élevé que chez l'Homme (80 - 100 $\mu\text{moles.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$: Figure 26).

Le tableau 8 présente les données d'études dans lesquelles la production hépatique de glucose et la variation de la concentration de glycogène hépatique ont été mesurées à l'exercice chez le Rat dans différents états nutritionnels [Donovan et Sumida, 1990; Ryan et al., 1993; Sonne et al., 1987; Sonne et Galbo, 1986; Sonne et al., 1985; Vissing et al., 1989; Vissing et al., 1988; Vissing et al., 1988a]. L'aire sous la courbe de la production hépatique de glucose a été utilisée pour déterminer la quantité totale de glucose libérée par le foie. La contribution de la glycogénolyse a été calculée en supposant que la masse totale du foie représentait 4 % du poids corporel [Sonne et al., 1987; Sonne et al., 1985; Vissing et al., 1989]. Chez le Rat nourri, les résultats montrent que la contribution moyenne de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse pour un exercice de 40 minutes sur tapis roulant (21 m/min, 0 % de pente) est de l'ordre de 33 à 44 et de 56 à 67 % respectivement (Figure 28). Après un demi jeûne [Sonne et al., 1987; Sonne et Galbo, 1986] ou un jeûne court [Vissing et al., 1988; Vissing et al., 1988a], la contribution respective de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse deviennent respectivement de l'ordre de 19 à 27 et de 73 à 81 %. Après 12 à 48 heures de jeûne, Ryan et al. [1993] et Donovan et Sumida [1990] ont montré que la néoglucogénèse contribuait pour plus de 95 % à la production hépatique de glucose durant l'exercice. Il est intéressant de noter que dans l'étude de Ryan et al. [1993] le flux néoglucogénique à partir du PEP a également été mesuré à l'aide d'une infusion de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$. Avec cette méthode, la contribution relative de la néoglucogénèse à la production totale de glucose était en moyenne de 50 %, suggérant que l'infusion de bicarbonates marqués sous-

Tableau 8: Production hépatique de glucose et contribution moyenne de la glycolyse et de la néoglucogénèse à l'exercice chez le Rat soumis à différentes conditions nutritionnelles.

Référence	Protocole	R _g gluc ($\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{ g}^{-1}$)	ASC R _g gluc (μmoles)	[glyc] init et fin ($\mu\text{moles/g}$)	GNG		Glycogénol	
					(μmoles)	(%)	(μmoles)	(%)
Sonne et al. [1985]	35 min T.R. (21 m/min, 0%)							
	nourri (PC: 217 g)	14,2	1079	250; 201	653	61	425	39
Sonne et Galbo [1986]	demi-jeun (PC: 232 g)							
	35 min T.R.							
	14 m/min, 0%	7,6	791	39; 21	624	79	167	21
	21 m/min, 0%	8,5	882	39; 13	641	73	241	27
Sonne et al. [1987]	35 min T.R. (21 m/min, 0%)							
	nourri (PC: 217 g)	14,7	2290	254; 138	1284	56	1007	44
	demi jeun (PC: 232 g)	7,9	1255	39; 13	1013	81	241	19
	à jeûn 48 h (PC: 190 g)	5,4	720	43; 13	151	68	228	32

Référence	Protocole	R _a gluc ($\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{ g}^{-1}$)	ASC R _a gluc (μmoles)	[glyc] init et fin ($\mu\text{moles/g}$)	GNG		Glycogénol	
					(μmoles)	(%)	(μmoles)	(%)
Vissing et al. [1988, 1988a]	à jeûn 8 h (PC: 213 g)	13,8	965	150; 123	714	74	251	26
	40 min repos + 35 min T.R. (21 m/min, 0%)							
Vissing et al [1989]	nourri (PC: 213 g) 35 min T.R. (21 m/min, 0%)	13,7	1025	181; 141	684	67	341	33
Ryan et al. [1993]	à jeûn 12 h (PC: 180 g) 4 h natation	9,8	8266	8,3; 1,4	8217	99	49	1
Donovan et Sumida [1990]	à jeûn 30 h (PC: 200 g) 50 min T.R. (21 m/min 0%)	9,9	998	15,6; 8,1	938	94	60	6

R_a gluc: Taux d'apparition du glucose circulant; ASC R_a gluc: Aire sous la courbe du taux d'apparition du glucose circulant.

[glyc] init et fin: Concentration de glycogène hépatique initiale et finale.

PC : Poids corporel utilisé pour estimer la masse du foie (4 % du poids corporel).

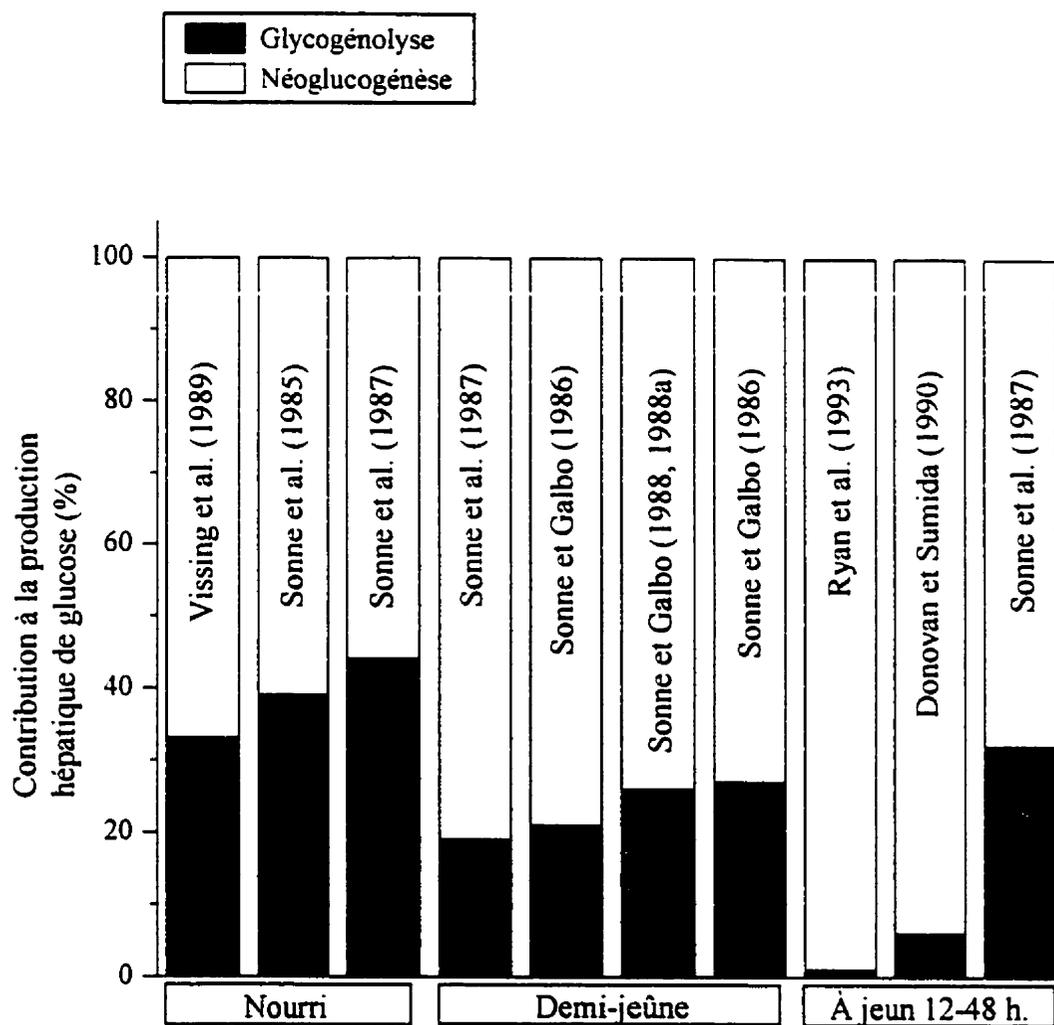


Figure 28: Contribution relative de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose chez le Rat à l'exercice et selon différents états nutritionnels. La figure résume les résultats des huit études présentées au Tableau 8.

estime le flux néoglucogénique à l'exercice par un facteur d'environ deux (le facteur de correction communément utilisé pour corriger pour la dilution et les échanges isotopiques est de l'ordre de 1,5 à 2,1 (voir section 2.2.2). Sonne et al. [1987] ont quant à eux rapporté que la néoglucogénèse contribuait pour seulement 68 % de la production totale de glucose chez des rats à jeun de 48 heures. Cette valeur est anormalement basse, d'autant plus que dans la même étude, la contribution moyenne de la néoglucogénèse rapportée chez des Rats à demi jeun était de 81 %.

Les résultats de deux études [John-Alder et al., 1986; Turcotte et al., 1990], dans lesquelles du 3-mercaptopicolinate (3-MPA) a été utilisé pour inhiber la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) chez des rats à l'exercice, suggèrent également que la néoglucogénèse est très importante pour permettre une production hépatique de glucose adéquate chez le Rat. John-Alder et al. [1986] ont rapporté une baisse de l'endurance de 32 % chez des rats traités au 3-MPA. Chez ces rats, la concentration plasmatique de glucose était significativement inférieure à celle des rats contrôles, bien que l'utilisation du glycogène ait été accrue de façon compensatoire (Figure 29). Turcotte et al. [1990] ont, quant à eux, utilisé du [6-³H₃]-glucose pour évaluer l'effet d'une injection de 3-MPA sur le taux de renouvellement du glucose circulant chez le Rat à l'exercice. Ces auteurs ont rapporté une incapacité marquée à accroître la production hépatique de glucose en réponse à l'exercice chez les Rats traités au 3-MPA et ce, en dépit de la présence d'une quantité substantielle de glycogène (316 μmoles/g) (Figure 30).

Globalement, les résultats présentés suggèrent que la réponse de la production hépatique de glucose au cours de l'exercice chez le Rat est relativement similaire à celle qui est observé chez l'Homme. Cependant, le foie du Rat semble plus rapidement dépendant envers la néoglucogénèse pour produire du glucose que ne peut l'être celui de l'Homme. Ceci est probablement dû au fait que les réserves de glycogène hépatique du Rat sont limitées et que le taux de renouvellement du glucose circulant est environ dix fois plus élevé que celui de l'Homme. Ainsi, la réponse du foie à l'exercice chez un Rat à jeun de 12 à 14 heures serait probablement plus aisément comparable à la réponse du

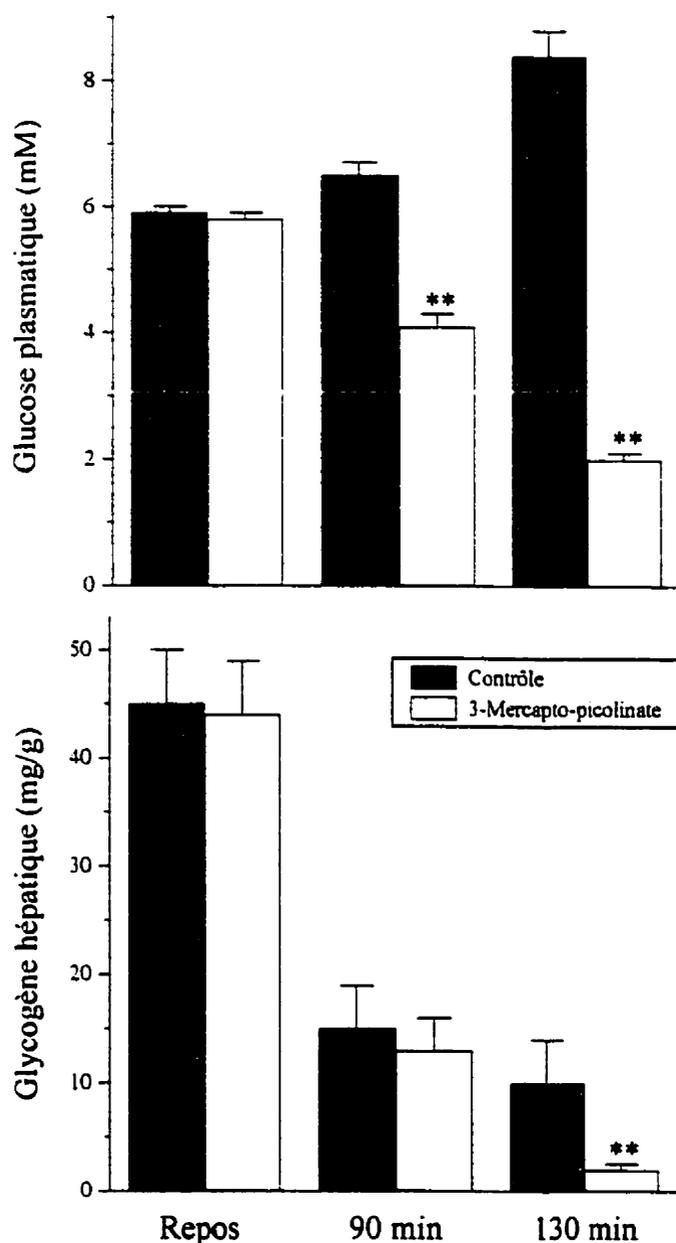


Figure 29: Effet de l'inhibition de la PEPCK avec du 3-mercaptopicolinate sur la variation de la glycémie et de la concentration de glycogène hépatique au cours de l'exercice prolongé chez le Rat. Les données sont tirées de l'étude de John-Alder et al. [1986]. Dans cette étude, des rats nourris ayant préalablement reçu une injection intra-péritonéale de 3-mercaptopicolinate (3-MPA), un inhibiteur non-compétitif de la PEPCK, ont été soumis à un exercice sur tapis roulant (30 min à 20 m/min et 0 % de pente, suivi de 75 min à 25 m/min et 15 % de pente) jusqu'à l'épuisement (durée moyenne: 130 min). Un protocole d'exercice de durée équivalente a été utilisé pour les rats contrôles ayant reçu une injection de saline. Dans les deux groupes expérimentaux, un partie des rats ont également été sacrifiés au repos et à la 90 ième minute d'exercice. **: différent du groupe contrôle, $P \leq 0,05$.

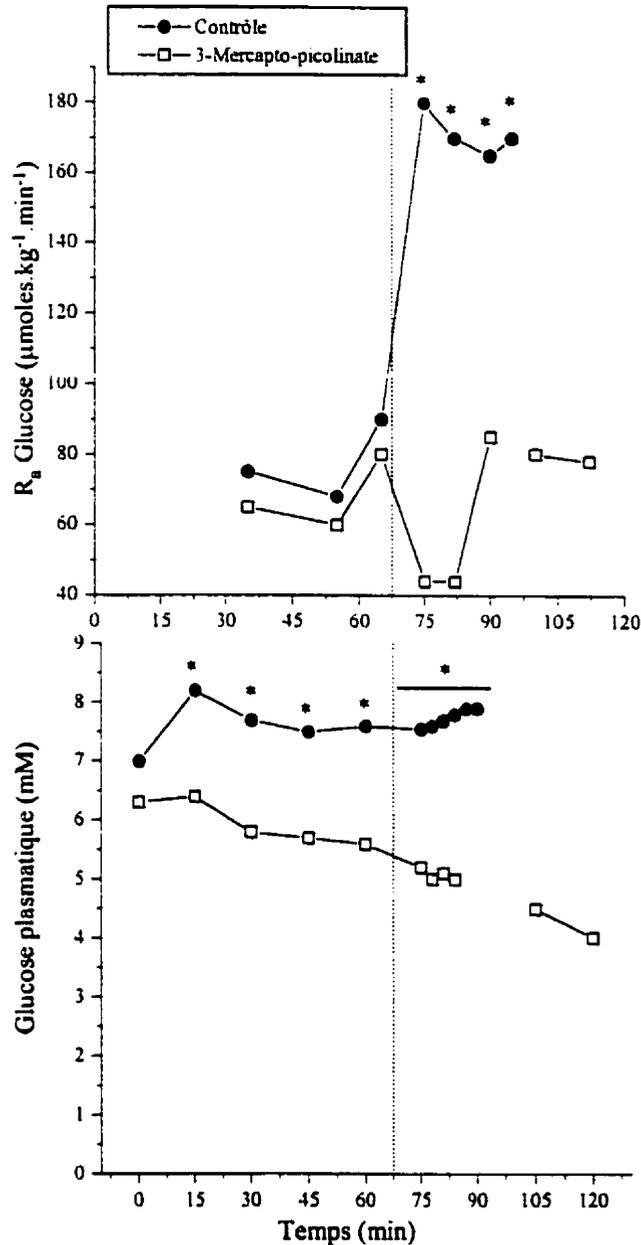


Figure 30: Effets de l'inhibition de la PEPCK avec du 3-mercaptopicolinate sur le taux de renouvellement du glucose circulant et sur la glycémie chez le Rat à l'exercice. Les données sont extraites de l'étude de Turcotte et Brooks [1990]. Dans cette étude des rats ayant subi un demi jeûne (10 g de nourriture durant les dernières 12 h.) ont été soumis à une période d'exercice sur tapis roulant (13.4 m/min, 0 % de pente) jusqu'à épuisement (durée moyenne : 35 min), après avoir reçu deux doses (90 min avant ainsi qu'au début de l'expérience) de 3 mercaptopicolinate (3-MPA), un inhibiteur non-compétitif de la PEPCK. La course des rats du groupe contrôle, ayant reçu deux injections d'une solution saline, était arrêté à la 35^{ème} minute. Le taux d'apparition du glucose circulant a été mesuré à l'aide d'une infusion constante de [6-³H]-glucose. * : différent du groupe 3-MPA, P ≤ 0,05.

foie chez un Homme à jeun de 60 heures. En effet, dans les deux cas, la contribution de la néoglucogénèse est proche de 100 %. De plus, la production hépatique de glucose est inférieure à celle qui est observée pour le même exercice effectué dans une condition où du glycogène est disponible, c'est-à-dire à l'état nourri chez le Rat (Tableau 8; Figure 28) et après 12 à 14 heures de jeûne chez l'Homme (Tableau 4: [Björkman et Eriksson, 1983]).

.4 Effet de l'entraînement en endurance sur le métabolisme du glucose circulant à l'exercice

Dans cette section, la synthèse des données disponibles concernant l'effet de l'entraînement sur le métabolisme du glucose circulant est présentée chez l'Homme et le Rat, chez qui la question a été étudiée. La synthèse des données disponibles est effectuée séparément chez ces deux espèces pour deux raisons. La première est que certaines adaptations à l'entraînement semblent différentes chez l'Homme et le Rat. Et la seconde raison est que les conditions expérimentales dans lesquelles les effets de l'entraînement ont été évalués sont très différentes chez les deux espèces, ce qui pourrait avoir un impact sur la nature des adaptations observées. En effet, les études chez l'Homme ont été effectuées à l'état nourri ou après un jeûne relativement court, tandis que chez le Rat, les études ont été effectuées dans des conditions de jeûne sévère.

.4.1 Effets de l'entraînement en endurance sur la production hépatique de glucose chez l'Homme

.4.1.1 Taux de renouvellement du glucose circulant

Au cours d'un exercice prolongé effectué à une puissance absolue comparable, il est connu que des sujets entraînés démontrent une capacité accrue à maintenir la glycémie stable comparativement aux sujets sédentaires [Koivisto et al., 1982]. Plusieurs études dans lesquelles des traceurs isotopiques ont été utilisés ont montré que ceci était probablement dû à une diminution de la dépendance des tissus périphériques envers le glucose circulant comme substrat énergétique [Bergman et al., 2000; Bergman et al., 1999; Coggan et al., 1995; Coggan et al., 1990; Friedlander et al., 1997; Mendenhall et

al., 1994; Phillips et al., 1996; Phillips et al., 1995]. En effet, ces études ont rapporté une diminution du taux de disparition (R_d) et de la clairance métabolique (MCR) du glucose circulant au cours d'exercices de 90 à 120 minutes effectués à une puissance modérée (60-65 % du VO_2 max pré-entraînement). Bergman et al. [1999], qui ont mesuré de façon simultanée le taux de renouvellement du glucose circulant et la différence artérioveineuse fémorale en glucose, ont montré que cette diminution de R_d et de MCR du glucose circulant était entièrement attribuable à une diminution de la prise de glucose par les muscles des membres inférieurs.

La conséquence immédiate de la diminution des besoins périphériques en glucose au cours de l'exercice est qu'une moins grande production de glucose par le foie est nécessaire pour maintenir la glycémie stable. À la suite d'un programme d'entraînement de 9 à 12 semaines (63-84 jours) plusieurs études ont rapporté une diminution de l'ordre de 20 à 42 % du taux d'apparition du glucose circulant [Bergman et al., 2000; Bergman et al., 1999; Coggan et al., 1995; Coggan et al., 1990; Friedlander et al., 1997] (Figure 31). Phillips et al. [1995] ainsi que Mendenhall et al. [1994] ont montré qu'après seulement 10 jours d'entraînement, une diminution de l'ordre de 22 à 25 % du R_a glucose était déjà observable. Cependant une dizaine de jours semble le délai minimal pour noter un changement, puisque Phillips et al. [1996] n'ont pas rapporté de baisse significative du R_a glucose après cinq jours d'entraînement.

Quelques études ont montré que la diminution du R_a et du R_d glucose ainsi que celle de la prise de glucose par les muscles au travail à la suite d'un entraînement est un phénomène qui semble s'observer seulement lorsque l'exercice est effectué à une puissance absolue comparable. En effet, trois études du groupe de Brooks ont montré que pour une même puissance relative (65 % du VO_2 max pré et post-entraînement soit une différence de puissance absolue de 21 et 26 W, dans la mesure où le programme d'entraînement utilisé a mené à une augmentation de l'ordre de 9 à 15 % du VO_2 max), le R_a et le R_d glucose [Bergman et al., 2000; Bergman et al., 1999; Friedlander et al., 1997] ainsi que la prise de glucose par les muscles des membres inférieurs [Bergman et al., 1999] étaient identiques avant et après le programme d'entraînement. Il est à noter que

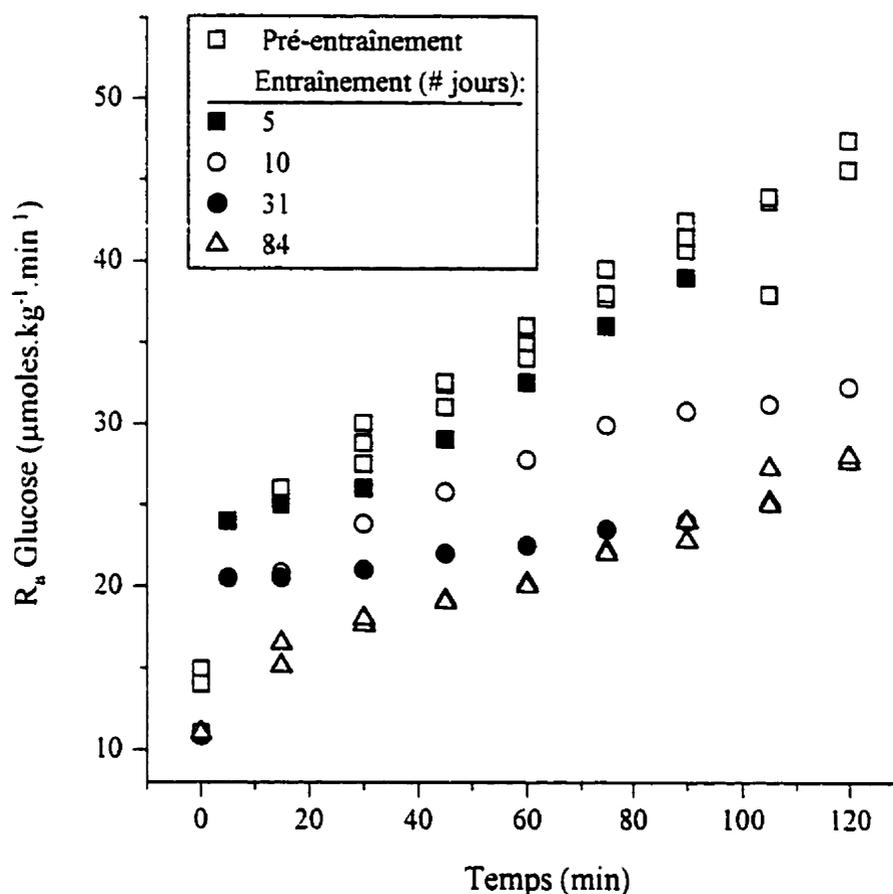


Figure 31: Effet d'un programme d'entraînement en endurance de durée variable sur le taux d'apparition du glucose circulant observé au cours d'un exercice prolongé effectué à puissances absolues comparables. Les données présentées sur cette figure proviennent des études de Coggan et al. [1990, 1995], Mendenhall et al. [1994], Phillips et al. [1996]. Dans l'ensemble de ces études la puissance absolue d'exercice était similaire (122-144 W) et le taux d'apparition du glucose circulant (R_a glucose) a été mesuré à l'aide de la même technique (infusion continue de $[6,6-^2H_2]$ -glucose).

dans ces trois études, une diminution significative du R_a et du R_d glucose ainsi que de la prise de glucose musculaire a été observée lorsque l'exercice était effectué à une puissance absolue comparable (environ 160 W ou 65 et 57 % du VO_2 max pré- et post-entraînement respectivement), ce qui apporte de la crédibilité aux résultats obtenus lors de l'exercice effectué à la même puissance relative (Figure 32). Kjær et al. [1986] ont également observé que le R_d glucose était similaire chez des sujets entraînés et sédentaires au cours d'un effort court et intense effectué à puissance relative comparable (3 min d'ergocycle à 100 % suivis de 2 min à 110 % du VO_2 max). Cependant, ces auteurs ont rapporté que chez les sujets entraînés, le R_a glucose était beaucoup plus élevé que chez les sujets sédentaires (environ 120 vs 75 $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$), menant à une élévation importante de la glycémie. Les données rapportées par Coggan et al. [1995a] sont, quant à elles, en conflit avec les résultats des quatre autres études qui ont évalué l'effet de l'entraînement au cours d'un exercice de puissance relative comparable [Bergman et al., 1999; Bergman et al., 2000; Friedlander et al., 1997; Kjær et al., 1986]. En effet, ces auteurs ont rapporté que le R_a et le R_d glucose étaient respectivement égal et inférieur au cours d'un exercice de 30 min effectué à 80 % du VO_2 max chez les sujets entraînés comparativement aux sujets sédentaires. Il semble que ces résultats conflictuels puissent cependant s'expliquer par une erreur méthodologique dans le protocole d'infusion du traceur isotopique [Coggan, 1998].

4.1.2 Contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose

Trois études ont évalué l'effet de l'entraînement en endurance sur la contribution respective de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose lors d'un exercice effectué à puissance absolue comparable [Bergman et al., 2000; Coggan et al., 1995; Friedlander et al., 1997]. Dans l'étude de Coggan et al. [1995] les sujets effectuaient un exercice sur ergocycle d'une durée de 120 minutes à une intensité correspondant à 60 % du VO_2 max pré-entraînement, avant et après avoir suivi un programme d'entraînement d'une durée de 12 semaines. Une infusion simultanée de [6,6- ^3H]-glucose et de $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ a été utilisée pour mesurer le R_a glucose et le flux de la néoglucogénèse à partir du PEP. Étant donné que l'exercice était effectué

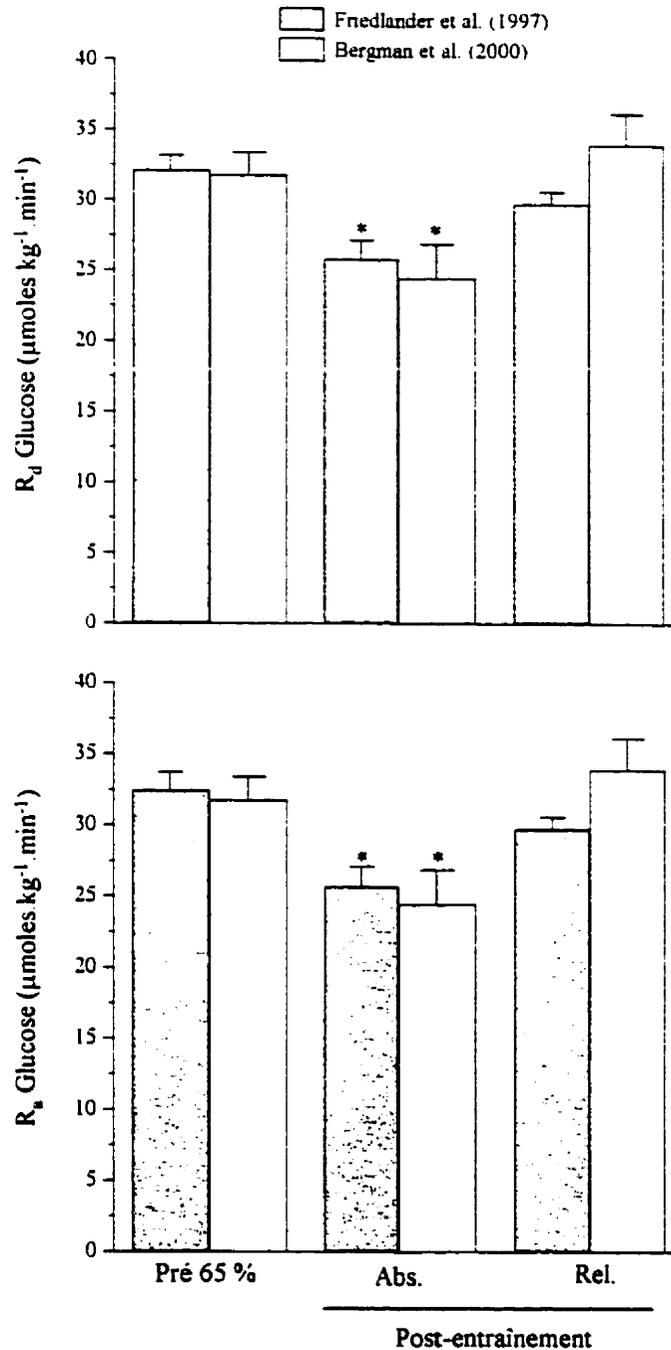
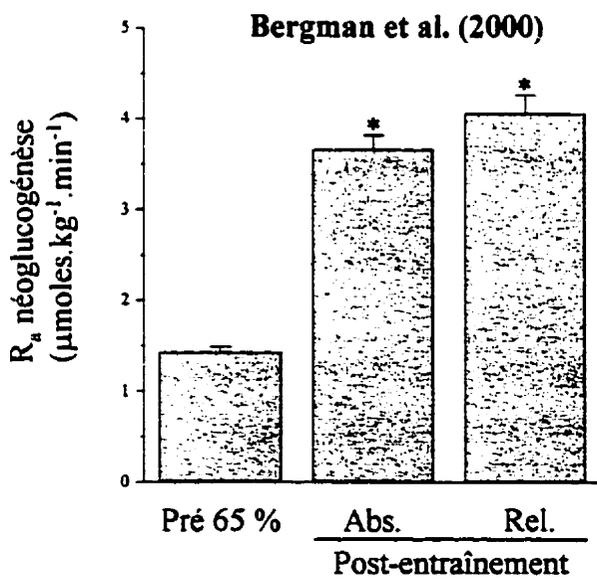
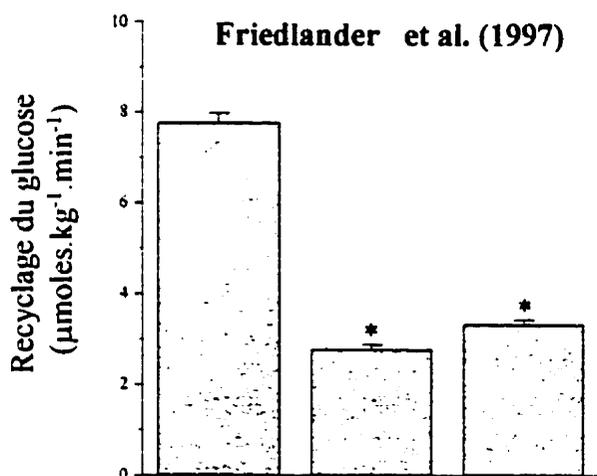
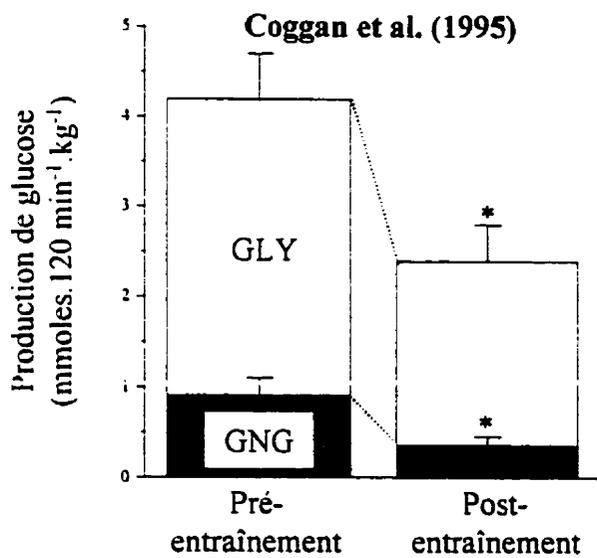


Figure 32: Effet de l'entraînement sur le taux de renouvellement du glucose circulant au cours d'un exercice effectué à puissances absolues et relatives comparables. Les données sont extraites des l'études de Friedlander et al. [1997] et Bergman et al., [2000] dans lesquelles les sujets ont été soumis à un programme d'entraînement d'une durée de 10 semaines. Les sujets effectuaient un exercice de 60 min sur ergocycle à 65 % du VO_2max avant de débiter le programme. À l'issue du programme les sujets étaient testés à deux reprises: à la même puissance absolue (Abs.: 152 W ou 65 % du VO_2max pré-entraînement) et à la même puissance relative (Rel. : 65 % du VO_2max pré- et post-entraînement: 152 vs 173 W respectivement). * : différent de Pré 65 %, $P \leq 0,05$.

après un jeûne de 12 à 14 heures, la glycogénolyse était le principal contributeur à la production hépatique de glucose (environ 72 % du R_a glucose moyen). Par conséquent, la diminution du R_a glucose observée en réponse à l'entraînement était principalement attribuable à une baisse du flux glycogénolytique (29,3 à 18,4 $\mu\text{moles}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) (Figure 33). Cependant, une diminution d'environ 50 % du flux néoglucogénique à partir du PEP ($7,5 \pm 1,6$ à $3,1 \pm 0,6$ $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$) a également été observée, contribuant pour environ 33 % de la diminution du R_a glucose. Friedlander et al. [1997] ont quant à eux utilisé une infusion simultanée de [6,6- ^3H]-glucose et de [1- $^{13}\text{C}_1$]-glucose au cours d'un exercice de 60 minutes effectué à 65 % du VO_2 max pré-entraînement. Ces auteurs ont calculé le R_a glucose et le taux de recyclage des carbones du glucose, qui est un index de la néoglucogénèse à partir du lactate et de l'alanine. En accord avec les résultats de l'étude de Coggan et al. [1995], Friedlander et al. [1997] ont rapporté une diminution du flux néoglucogénique de 62 % (7,7 à 4,7 $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$) contribuant pour 55 % de la diminution du R_a glucose (32,4 à 25,7 $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$) induite par l'entraînement (Figure 33). Dans une étude récente, Bergman et al. [2000] ont utilisé une infusion de [6,6- ^2H]-glucose et de [3- $^{13}\text{C}_1$]-lactate pour mesurer le R_a glucose et la néoglucogénèse à partir du lactate au cours d'un exercice de 60 minutes effectué à 65 % du VO_2 max pré-entraînement. Ces auteurs ont également rapporté une baisse de 32 % du flux de la glycogénolyse post-entraînement (30,3 à 20,4 $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$). Cependant, contrairement aux résultats des études de Coggan et al. [1995] ainsi que ceux de Friedlander et al. [1997], une augmentation de 180 % de la néoglucogénèse à partir du lactate a été observée post-entraînement (1,3 à 4 $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$) (Figure 33).

Seules les études longitudinales de Bergman et al. [2000] et Friedlander et al. [1997] ont évalué l'effet de l'entraînement sur la contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose au cours d'un exercice effectué à puissance relative comparable (60 min à 65 % du VO_2 max pré- et post-entraînement). Friedlander et al. [1997] ont observé une diminution d'environ 50 % du recyclage des carbones du glucose (un index de la néoglucogénèse) et ce, malgré le fait que le R_a glucose était similaire pré- et post-entraînement (Figure 33). Cette étude [Friedlander et al., 1997] suggère donc que la contribution de la glycogénolyse au R_a glucose était plus

Figure 33: Effet d'un programme d'entraînement en endurance sur la contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose au cours d'un exercice prolongé d'intensité modérée. La figure tirée de l'étude de Coggan et al. (1995) présente la quantité totale de glucose produite, ainsi que la contribution moyenne de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse, au cours d'un exercice de 120 min d'ergocycle à 60 % du VO_2max pré-entraînement, avant et après un programme d'entraînement de 12 semaines. La contribution de la néoglucogénèse a été mesurée à l'aide du rapport $\text{APE } ^{13}\text{C-glucose} / \text{APE } ^{13}\text{CO}_2$ lors d'une infusion de $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$. La contribution de la glycogénolyse a été calculée par différence entre le taux d'apparition du glucose circulant et le flux néoglucogénique. *: différent de pré-entraînement, $P \leq 0,05$. Les figures tirées de l'étude de Friedlander et al. (1997) et de Bergman et al., (2000) présentent respectivement le taux moyen de recyclage des carbones du glucose par le cycle de Cori et la production de glucose par la néoglucogénèse au cours d'un exercice de 60 min d'ergocycle effectué à puissance absolue (Abs.) et relative (Rel.) comparable avant et après le suivi d'un entraînement de 10 semaines (voir la légende de la figure 24 pour les détails). Dans l'étude de Friedlander et al. (1997), le taux de recyclage a été déterminé à l'aide de l'infusion simultanée d'un traceur réversible ($[1-^{13}\text{C}_1\text{-glucose}]$) et irréversible ($[6,6-^2\text{H}_2\text{-glucose}]$) du glucose. Dans l'étude de Bergman et al., (2000), le flux de la néoglucogénèse a été déterminé à l'aide de l'infusion simultanée de $[3-^{13}\text{C}_1\text{-lactate}]$ et de $[6,6-^2\text{H}_2\text{-glucose}]$. *: différent de Pre 65 %, $P \leq 0,05$.



grande post-entraînement. À l'opposé, Bergman et al. [2000] ont montré, que pour un R_a glucose similaire, voire légèrement supérieur post-entraînement, le flux néoglucogénique était 3 fois plus élevé post-entraînement ($0,75$ vs $0,25 \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$) (Figure 33).

De façon générale, les études longitudinales de Bergman et al. [2000] et de Friedlander et al. [1997] sont en conflit au sujet de l'effet de l'entraînement sur la contribution de la néoglucogénèse à l'exercice et ce, malgré l'emploi d'un programme d'entraînement et d'un protocole expérimental similaire. En effet, Friedlander et al. [1997] ont rapporté une diminution du flux néoglucogénique post-entraînement, que la comparaison soit effectuée à la même puissance absolue ou relative d'exercice. Au contraire, Bergman et al. [2000] ont rapporté une hausse du flux néoglucogénique post-entraînement pour les deux cas. Cependant, certains arguments portent à croire que la méthode utilisée dans l'étude de Friedlander et al. [1997] est la cause de cette divergence. En effet dans cette étude, le flux de la néoglucogénèse a été estimé à partir du taux de recyclage du ^{13}C lors d'une infusion simultanée de $[6,6\text{-}^2\text{H}]\text{-glucose}$ et de $[1\text{-}^{13}\text{C}_1]\text{-glucose}$. Avec cette méthode, une sous-estimation du recyclage isotopique et donc du flux néoglucogénique peut survenir dans le cas où:

- 1) le R_a glucose et la prise de glucose par les muscles au travail sont diminués
- 2) le R_a lactate et la production de lactate par les muscles au travail sont diminués
- 3) la fraction du R_a lactate qui est oxydée dans les muscles au travail est augmentée.

Or, il est connu que l'entraînement en endurance est associé à un ou plusieurs de ces effets sur le métabolisme du glucose et du lactate au cours d'un exercice effectué à puissance absolue et relative comparable [Bergman et al., 1999a]. Il est donc possible qu'à la suite d'un entraînement, la méthode employée par Friedlander et al. [1997] n'ait pas permis de mettre en évidence une augmentation du flux néoglucogénique pour une ou plusieurs de ces raisons. Le fait que dans l'étude de Bergman et al. [2000], un vrai traceur du lactate ait été utilisé ($[3\text{-}^{13}\text{C}_1]\text{-lactate}$) élimine ces sources potentielles d'erreurs. Par contre, les résultats divergents obtenus par Coggan et al. [1995] et

Bergman et al. [2000], lorsque deux vrais traceurs de la néoglucogénèse ont été utilisés ($[3-^{13}\text{C}_1]$ -lactate et $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$, respectivement) au cours d'un exercice de puissance absolue comparable demeure difficile à expliquer.

Dans l'ensemble, il semblerait que l'entraînement en endurance induit une diminution rapide du taux de renouvellement du glucose circulant au cours des dix premiers jours (22 à 25 %), après quoi la diminution est plus lente (0 à 20 % au cours des 53 à 74 jours). Par contre, cette diminution des besoins périphériques en glucose et donc de la production hépatique de glucose est uniquement observable lorsque l'exercice est effectué à puissance absolue comparable. En effet, lorsque la puissance d'exercice est corrigée à la hausse, de façon à tenir compte de l'augmentation de la capacité aérobie maximale, l'entraînement ne semble pas avoir d'effet sur la réponse de la production hépatique de glucose ni sur l'utilisation du glucose circulant au cours de l'exercice prolongé d'intensité modéré. Lorsque l'intensité d'exercice est très élevée, les données de Kjær et al. [1986] suggèrent que la capacité maximale du foie à produire du glucose serait plus élevée chez les sujets entraînés que chez les sujets sédentaires. Les données obtenues par le groupe de Brooks [Bergman et al., 2000; Bergman et al., 1999; Friedlander et al., 1997] et par Kjær et al. [1986] suggèrent donc que chez les athlètes d'élite comme chez les sportifs occasionnels, qui travaillent à une puissance absolue et relative plus élevée que les sujets sédentaires, la diminution du taux de renouvellement du glucose circulant n'est probablement pas un facteur expliquant l'amélioration de la performance.

En ce qui a trait à l'effet de l'entraînement sur la glycogénolyse et la néoglucogénèse hépatique, les résultats disponibles ne peuvent probablement pas être interprétés en termes quantitatifs, compte tenue de la nature des méthodes utilisées (Sections 2.1.3 et 2.1.4). Il est néanmoins possible de conclure que, pour une puissance absolue comparable la diminution de la production hépatique de glucose observée en réponse à l'entraînement est en partie due à une réduction de la glycogénolyse. Il est difficile d'établir des conclusions aussi claires au sujet de la néoglucogénèse. Cependant, il est tentant de croire, comme le montre l'étude récente de Bergman et al. [2000], que

l'entraînement augmente la néoglucogénèse. En effet, ceci serait compatible avec l'ensemble des données obtenues chez le Rat à la fois *in vivo* et *in vitro*.

4.1.3 Effet de l'entraînement en endurance sur les mécanismes de régulation de la production hépatique de glucose

Un des principaux mécanismes proposé pour expliquer la baisse du R_a glucose induite par l'entraînement lors d'un exercice de puissance absolue comparable, est l'atténuation de la réponse hormonale à l'exercice [Coggan, 1997; Coggan et Williams, 1995]. En effet, la diminution de la concentration d'insuline en réponse à l'exercice est moindre chez des sujets entraînés [Bergman et al., 1999; Bloom et al., 1976; Coggan et al., 1990; Gyntelberg et al., 1977; Hartley et al., 1972, Hartley et al., 1972a; Mendenhall et al., 1994; Winder et al., 1979]. L'entraînement est également associé à une moins grande augmentation de la concentration plasmatique de glucagon en réponse à l'exercice prolongé [Bergman et al., 1999; Bloom et al., 1976; Coggan et al., 1990; Gyntelberg et al., 1977; Koivisto et al., 1982; Mendenhall et al., 1994; Winder et al., 1979]. Et de ce fait, le rapport insuline/glucagon qui est un régulateur important de la production hépatique de glucose, est plus élevé chez des sujets entraînés. Une diminution de la réponse sympatho-adrénergique en réponse à l'entraînement a également été observée dans plusieurs études longitudinales [Green et al., 1991; Green et al., 1989; Koivisto et al., 1982; Mendenhall et al., 1994; Winder et al., 1978] et transversales [Bloom et al., 1976; Hartley et al., 1972; Hartley et al., 1972a] dans lesquelles les concentrations d'adrénaline et de noradrénaline ont été mesurées.

Il semble cependant que l'atténuation de la réponse hormonale induite par l'entraînement est un phénomène qui, tout comme la baisse du taux de renouvellement du glucose circulant, n'est observable seulement lorsque l'exercice est effectué à puissance absolue comparable. En effet, Deuster et al. [1989] ont montré que lorsque la puissance d'exercice est exprimée en terme relatif, la réponse de l'insuline et des hormones contre-régulatrices au cours d'un exercice de puissance modérée est généralement la même, peu importe le niveau d'entraînement. Cette observation suggère que l'absence de différence au niveau du profil hormonal entre les entraînés et les

sédentaires, pourrait en partie expliquer pourquoi la production hépatique de glucose est similaire dans ces deux groupes lors d'un exercice d'intensité modérée effectué à puissance relative comparable. Dans le même ordre d'idée, Kjær et al. [1986] ont même proposé que la plus grande production hépatique de glucose observée chez les sujets entraînés au cours d'un exercice très intense était probablement due à une réponse sympatho-adrénergique accrue. Dans cette étude, la concentration des catécholamines circulantes était en effet 2,5 fois plus élevée chez les sujets entraînés que chez les sujets sédentaires.

Bien que la modification de la réponse hormonale soit certainement un élément d'explication majeur, elle ne semble pas l'unique facteur impliqué. En effet, les études montrent que la modification de la réponse hormonale à l'exercice de puissance absolue comparable est essentiellement complétée après 10 à 12 jours d'entraînement alors que le R_a glucose continue de diminuer jusqu'à 84 jours après le début d'un programme d'entraînement [Coggan, 1997; Coggan et Williams, 1995; Mendenhall et al., 1994]. De plus, les effets de l'entraînement sur la concentration plasmatique d'insuline et de glucagon sont la plupart du temps observés au cours de la deuxième heure d'exercice, alors que la baisse du R_a glucose est clairement observable dès les premières minutes d'effort [Coggan, 1997; Coggan et al., 1995; Mendenhall et al., 1994].

Le groupe de Coggan a donc suggéré qu'une modification de la sensibilité hépatique aux hormones glucorégulatrices en réponse à l'entraînement pourrait en partie expliquer la diminution du R_a glucose chez les sujets entraînés [Coggan, 1997; Coggan et al., 1995; Mendenhall et al., 1994]. Pour que cette hypothèse soit valide, l'entraînement devrait en théorie induire une augmentation de la sensibilité hépatique à l'insuline et une diminution de la sensibilité au glucagon et aux catécholamines. Mais, aucune donnée ne semble disponible concernant l'effet de l'entraînement sur la sensibilité hépatique aux catécholamines chez l'Homme. Cependant, Podolin et al. [1994] ont montré qu'*in vitro* chez le Rat, la sensibilité hépatique à la noradrénaline est augmentée (Section 4.2.3).

Il existe une littérature abondante qui montre que l'entraînement améliore la tolérance au glucose lors de tests oraux et intra-veineux ainsi que lors de verrouillages hyperinsulinémiques-euglycémiques, à cause d'une augmentation de la sensibilité à l'insuline [Dela, 1996]. Cependant, ces données ne permettent pas de déterminer de manière distincte la sensibilité du foie et des tissus périphériques à l'insuline.

En ce qui concerne la sensibilité au glucagon, les résultats de Drouin et al. [1998] suggèrent qu'elle serait plutôt augmentée par l'entraînement. Dans cette étude, la production hépatique de glucose et la concentration plasmatique de glucose étaient plus élevées chez les sujets entraînés comparativement aux sujets sédentaires lors d'un test d'hyperglucagonémie induite, pendant lequel le rapport insuline/glucagon était fixé grâce à une infusion d'insuline (Figure 34). Ces résultats sont compatibles avec les données obtenues *in vitro* sur des tranches de foie de Rat incubées [Podolin et al., 1996] qui montrent un accroissement de la sensibilité hépatique au glucagon.

Outre les modifications de la concentration des diverses hormones glucorégulatrices et/ou de la sensibilité hépatique à ces hormones, Coggan et al. [1995] ont suggéré que la diminution de la concentration plasmatique de lactate et de glycérol observée en réponse à l'entraînement pourrait en partie expliquer la diminution du flux néoglucogénique et donc du R_a glucose. Cette hypothèse est en accord avec les résultats de l'étude de Friedlander et al. [1997] qui ont montré qu'après un entraînement de 9 semaines, la clairance du lactate à des fins de néoglucogénèse ainsi que la concentration de lactate étaient significativement abaissées au cours d'un exercice de puissance absolue et relative comparable. Il est cependant important de rappeler que les résultats rapportés par Friedlander et al. [1997] pourraient ne pas refléter la réalité pour des raisons d'ordre méthodologique (Section 4.1.2). Les résultats de l'étude de Bergman et al. [2000] sont, quant à eux, en désaccord avec l'hypothèse formulée par Coggan et al. [1995]. En effet, Bergman et al. [2000] ont montré que pour une concentration donnée de lactate dans le sang artériel, le flux néoglucogénique était systématiquement plus élevé au repos et au cours d'exercices de différentes puissances après le suivi d'un programme d'entraînement.

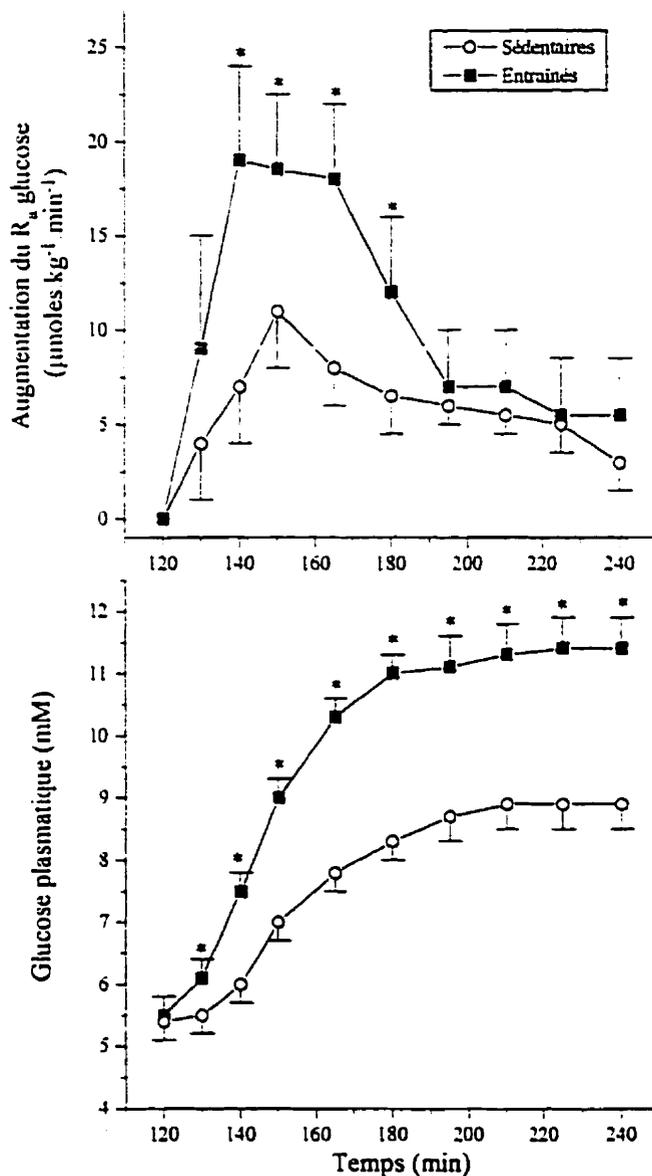


Figure 34: Réponse de la production hépatique de glucose et de la glycémie lors d'un test d'hyperglucagonémie provoquée au repos chez des sujets sédentaires et entraînés. Les données sont extraites [1998]. Les deux figures montrent l'augmentation de la production hépatique de glucose au dessus de la valeur de base ainsi que la glycémie en réponse à l'infusion continue de glucagon effectué au cours des deux dernières heures de l'expérience ($1,5 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$). Au cours de l'étude (4 heures au total), la production endogène d'insuline et de glucagon a été supprimée à l'aide d'une infusion de somatostatine. Une infusion constante de $[6,6\text{-}^2\text{H}_2]\text{-glucose}$ a été utilisée pour mesurer la production hépatique de glucose. Durant les deux premières heures de stabilisation (données non-représentés), la glycémie a été verrouillée à 5 mM à l'aide d'une infusion variable de glucose et l'insuline a été remplacée à l'aide d'une infusion exogène continue ($0,15 \text{ mU.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$). * : différent des sujets sédentaires, $P \leq 0,01$.

De façon générale, les études suggèrent que l'atténuation de la réponse hormonale est un des principaux facteurs responsables de la baisse de la production hépatique de glucose observée chez des sujets entraînés au cours d'un exercice effectué à puissance absolue comparable. Au cours d'un exercice d'intensité modérée effectué à puissance relative comparable, l'absence de modification de la réponse hormonale semble, quant à elle, à l'origine de l'absence de différence au niveau de la production hépatique de glucose observée à la suite d'un entraînement. Au contraire une réponse hormonale accrue, notamment celle des catécholamines, pourrait expliquer pourquoi le foie des sujets entraînés à une plus grande capacité à produire du glucose au cours d'efforts très intenses. Finalement, l'hypothèse qu'une diminution de la sensibilité hépatique aux hormones glucorégulatrices soit impliquée dans la moindre stimulation du R_a glucose semble, quant à elle, peu probable. En effet, l'entraînement a plutôt été associé à une hausse de la sensibilité hépatique au glucagon chez l'Homme ainsi qu'au glucagon et aux catécholamines chez le Rat.

.4.2 Effets de l'entraînement sur la production hépatique de glucose chez le Rat

.4.2.1 Taux de renouvellement du glucose circulant

Les études menées chez le Rat ont investigué l'effet de l'entraînement en endurance sur le métabolisme du glucose circulant au cours d'un exercice à puissance absolue comparable. Il est cependant important de noter que la puissance d'exercice est beaucoup plus difficile à contrôler chez le Rat que chez l'Homme, si bien que les comparaisons pourraient également avoir été faites à des puissances relatives comparables, sans qu'il soit possible de le vérifier.

Comme chez l'Homme [Koivisto et al., 1982], l'entraînement chez le Rat a été associé à un accroissement de la résistance à l'hypoglycémie [Donovan et Brooks, 1983; Winder et al., 1981]. Cependant, contrairement à ce qui est observé chez l'Homme, ceci ne semble pas dû à une diminution de la prise de glucose par les tissus périphériques, mais plutôt à un accroissement de la capacité du foie à produire du glucose [Brooks et Donovan, 1983; Donovan et Sumida, 1990; Sumida et Donovan, 1994]. En effet, Donovan et Sumida [1990] ont montré que, durant les 30 premières minutes d'un exercice de 60 minutes sur tapis roulant (21 m/min, 0 % de pente) effectué après un

jeûne de 30 heures, le R_a glucose circulant était plus élevé chez les rats entraînés que les rats sédentaires, alors que le R_d glucose était similaire dans les deux groupes. Les auteurs ont conclu que la résistance accrue à l'hypoglycémie observée chez les rats entraînés était due au moindre déséquilibre entre la production et l'utilisation du glucose circulant (Figure 35). Sumida et Donovan [1994] ont apporté un support direct à l'hypothèse que, chez le Rat la prise de glucose par les muscles à l'exercice n'est pas augmentée à la suite d'un entraînement en endurance. Ces auteurs ont en effet montré que la prise de 2-[1,2- ^3H]-désoxyglucose par les muscles squelettiques et le myocarde était similaire chez les rats entraînés et sédentaires courant pendant 55 minutes à une vitesse de 20 m/min.

4.2.2 Contribution de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse à la production hépatique de glucose

Plusieurs arguments sont en faveur de l'hypothèse que, l'accroissement de la capacité du foie à produire du glucose, observée *in vivo* chez des rats entraînés à l'exercice, est largement due à un accroissement de la capacité néoglucogénique. Le premier argument est que dans la majorité des études qui se sont intéressées à cette question, les rats ont été étudiés à la suite d'un jeûne de 12 à 48 heures, c'est-à-dire dans une situation où la production hépatique de glucose est presque entièrement assurée par la néoglucogénèse [Donovan et Sumida, 1990; Péroni et al., 1997; Péroni et al., 1995; Previs et al., 1995; Ryan et al., 1993; Winder et al., 1982].

Le deuxième argument provient des études de Donovan sur le métabolisme du ^{14}C - et du ^3H -lactate [Donovan et Brooks, 1983; Donovan et Pagliassotti, 1990; Donovan et Pagliassotti, 1989] ainsi que du ^{14}C - et du ^3H -glucose [Donovan et Brooks, 1983] à l'exercice. Donovan et Brooks [1983] ont montré que la diminution de la concentration plasmatique de lactate à l'exercice continu chez les rats entraînés n'était pas due à une diminution de la production de lactate par les tissus périphériques, mais bien à une augmentation de sa clairance. Cette étude a montré que chez les rats entraînés, la perte de carbones du ^{14}C -lactate sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ était diminuée, alors que l'incorporation de ^{14}C dans le glucose circulant par la néoglucogénèse, était

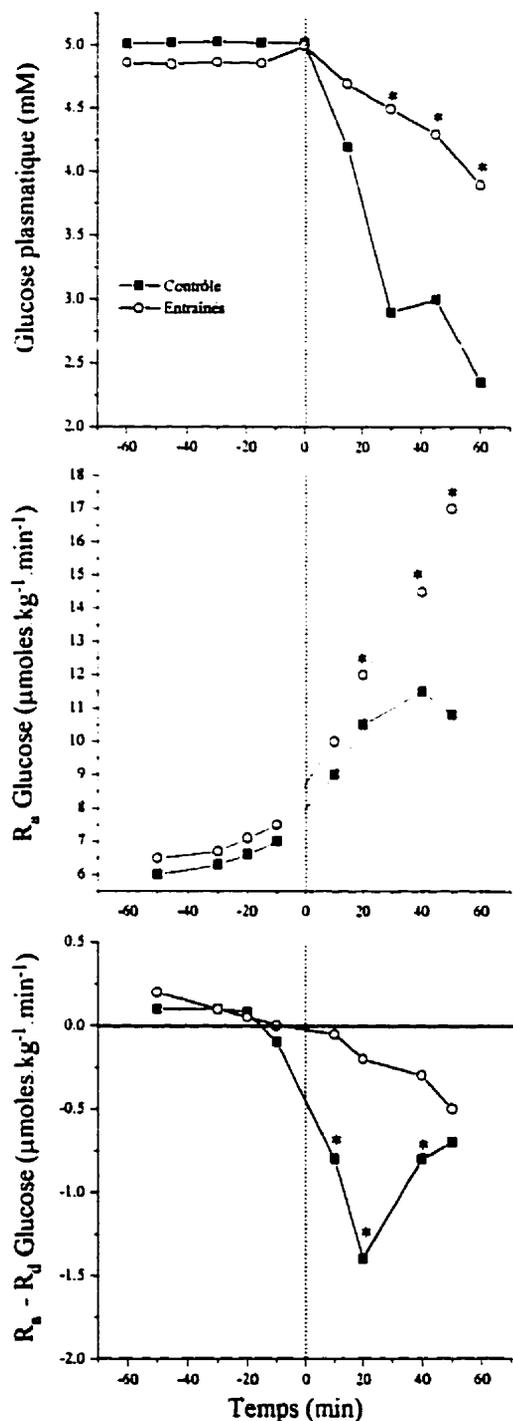


Figure 35: Effet de l'entraînement en endurance sur le métabolisme du glucose circulant au repos et à l'exercice chez le Rat. Les données sont tirées de l'étude de Donovan et Sumida [1990]. Les figures présentent la glycémie, le taux d'apparition (R_a glucose) ainsi que la différence entre le taux d'apparition et de disparition ($R_a - R_d$ glucose) du glucose circulant, au repos et à l'exercice (60 min. de tapis roulant, 21 m/min, 0 % de pente) chez des rats sédentaires et entraînés (60 min de tapis roulant, 35 m/min, 10% grade, 5 jours/sem., 8 sem.) à jeun de 30 h. * : différent des rats sédentaires, $P \leq 0,05$.

augmentée. L'accroissement de la capacité à métaboliser le lactate à la suite d'un entraînement a ensuite été confirmée par Donovan et Pagliassotti [1990; 1989]. Ces auteurs ont montré que la clairance du lactate, durant une hyperlactatémie provoquée au repos, était supérieure chez des rats entraînés comparativement aux rats sédentaires. Cette étude a également démontré que ceci était dû à une augmentation du flux néoglucogénique plutôt qu'à une augmentation de l'oxydation du ^{14}C -lactate en $^{14}\text{CO}_2$. De façon générale, ces données [Donovan et Pagliassotti, 1990; Donovan et Pagliassotti, 1989; Donovan et Brooks, 1983] sont compatibles avec les résultats de Donovan et Sumida [1990]. Ces auteurs ont montré que le taux de recyclage apparent du glucose, mesuré à l'aide d'une infusion simultanée de $[6\text{-}^3\text{H}_1]$ -glucose et de $[\text{U-}^{14}\text{C}_6]$ -glucose, était supérieur chez les rats entraînés comparativement aux rats sédentaires.

L'étude de Turcotte et Brooks [1990], dans laquelle le 3-MPA a été utilisé pour inhiber la néoglucogénèse chez des rats sédentaires et entraînés, apporte un troisième argument en faveur de l'hypothèse que l'augmentation de la capacité néoglucogénique est à l'origine de la résistance accrue à l'hypoglycémie observée chez le Rat entraîné à l'exercice. Dans cette étude, une combinaison de traceur réversible ($[\text{U-}^{14}\text{C}_6]$ -glucose) et irréversible ($[6\text{-}^3\text{H}_1]$ -glucose) du glucose a été utilisée pour mesurer le taux de renouvellement du glucose circulant et le recyclage apparent des carbones du glucose par le cycle de Cori. Les résultats ont montré que le 3-MPA inhibait complètement le cycle de Cori chez les rats sédentaires et entraînés et que chez les rats entraînés ceci était associé à la disparition de l'effet protecteur de l'entraînement contre l'hypoglycémie d'exercice.

4.2.3 Mécanismes impliqués dans l'accroissement de la capacité néoglucogénique

Plusieurs études *in vitro* ont été tout d'abord effectuées pour confirmer le fait que l'entraînement augmentait la capacité néoglucogénique ainsi que pour essayer d'identifier les mécanismes impliqués. Sumida et al. [1993] ont utilisé un modèle de foie isolé perfusé *in situ* avec du lactate. Sumida et Donovan [1995] ont utilisé le même modèle pour mesurer la néoglucogénèse à partir de l'alanine, du dihydroxyacétone (DHA) et de la glutamine. Le groupe de Mazzeo [Horn et al., 1997; Podolin et al., 1996;

Podolin et al., 1994] a, quant à lui, utilisé des tranches de foie incubées pour étudier l'effet de l'entraînement en endurance sur la diminution de la capacité néoglucogénique reliée au vieillissement. Dans plusieurs études, l'expression [Horn et al., 1997] et l'activité d'enzymes impliqués [Horn et al., 1997; Huston et al., 1975; Ji et al., 1986; Sumida et al., 1995; Winder, 1985] ou non [Dohm et al., 1976; Kraus et Kirsten, 1970] dans la néoglucogénèse ont également été mesurées. Finalement, Bobyleva-Guarriero et Lardy [1986] ont utilisé un modèle d'hépatocytes isolés pour mesurer la néoglucogénèse à partir du lactate, du pyruvate et de l'alanine.

Les résultats de l'étude de Sumida et al. [1993] obtenus avec des foies perfusés de rats à jeun de 24 heures ont montré que l'entraînement en endurance (8 semaines, 5 jours/semaine) était associé à une augmentation de 25 % de la production de glucose lorsque du [U-¹⁴C₆]-lactate était perfusé en concentration saturante (supérieur à 2 mM dans ces conditions) (Figure 36). Cette augmentation était associée à une augmentation de la prise de lactate et de l'incorporation de ¹⁴C dans le glucose de 25 et 23 % respectivement, ce qui confirme que l'augmentation de la production hépatique de glucose était effectivement due à une augmentation du flux néoglucogénique. La consommation d'oxygène du foie était également plus élevée dans le groupe de rats entraînés comparativement au groupe de rats contrôles (3,74 ± 0,15 vs 3,13 ± 0,15 μmoles.min⁻¹.g⁻¹ tissu frais), en accord avec l'augmentation de la production d'ATP nécessaire à la synthèse de glucose (6 moles d'ATP par mole de glucose à partir du lactate). Podolin et al. [1994] ont confirmé les résultats obtenus par Sumida et al. [1993] en montrant que l'entraînement en endurance (10 semaines, 5 jours/semaine) permettait d'atténuer l'importance de la diminution de la capacité néoglucogénique du foie à partir du lactate observée au cours du vieillissement. En effet, chez des rats entraînés d'âge moyen (12 mois) et des rats âgés (22 mois), la production de glucose était de 113 à 213 % plus élevée que chez des rats sédentaires d'âges comparables, lorsque des tranches de foies étaient incubées en présence de lactate. Sur des hépatocytes isolés incubés, Bobyleva-Guarriero et Lardy [1986] n'ont pas trouvé d'effet de l'entraînement sur la néoglucogénèse à partir du lactate et du pyruvate lorsque les hépatocytes étaient isolés chez des rats à jeun au repos. Par contre, ces auteurs ont trouvé que le flux

néoglucogénique à partir du lactate et du pyruvate était plus élevé dans les hépatocytes de rats entraînés ($1,13 \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ poids frais) que dans les hépatocytes de rats sédentaires ($0,75 \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ poids frais), lorsque le jeûne était combiné à une période d'exercice de 1 heure.

Sumida et Donovan [1995] ont obtenu des résultats similaires à ceux de Sumida et al. [1993] lorsque des foies étaient perfusés en présence d'alanine en concentration saturante (10 mM dans ces conditions) (Figure 36). En effet, la production hépatique de glucose, la prise d'alanine et l'incorporation de ^{14}C dans le glucose étaient respectivement de 28, 30 et 26 % plus élevées dans le groupe entraîné comparativement au groupe contrôle. En revanche, ces auteurs n'ont trouvé aucune différence au niveau de la production de glucose à partir du DHA et de la glutamine.

Sumida et Donovan [1995] ont émis des hypothèses concernant les mécanismes intracellulaires par lesquels l'entraînement augmente la capacité néoglucogénique. D'après l'observation que la néoglucogénèse à partir du DHA était inchangée alors que celle du lactate et de l'alanine était augmentée, ces auteurs ont suggéré que l'entraînement affectait une ou plusieurs étape(s) située(s) en amont des trioses-phosphates (DHAP et GAP), probablement au niveau du cycle phosphoénol-pyruvate – pyruvate (Figure 37). Cependant, les études qui ont mesuré l'activité enzymatique de la PC [Horn et al., 1997; Huston et al., 1975] et de la PEPCK [Horn et al., 1997; Huston et al., 1975; Sumida et al., 1993; Winder, 1985] ainsi que l'expression de l'ARNm de la PEPCK [Horn et al., 1997] n'ont pas rapporté d'augmentation induite par l'entraînement.

L'activité de plusieurs autres enzymes hépatiques a été mesurée chez des rats sédentaires et entraînés. Kraus et Kirsten [1970] ont trouvé une augmentation de l'activité de la succinate déshydrogénase et du contenu en cytochrome chez des rats ayant suivi un programme chronique d'entraînement sur tapis roulant. Ji et al. [1986] ont rapporté une augmentation de l'activité de la malate déshydrogénase et de l'alanine transaminase mitochondriale. Sumida et Donovan [1995] ont rapporté une augmentation

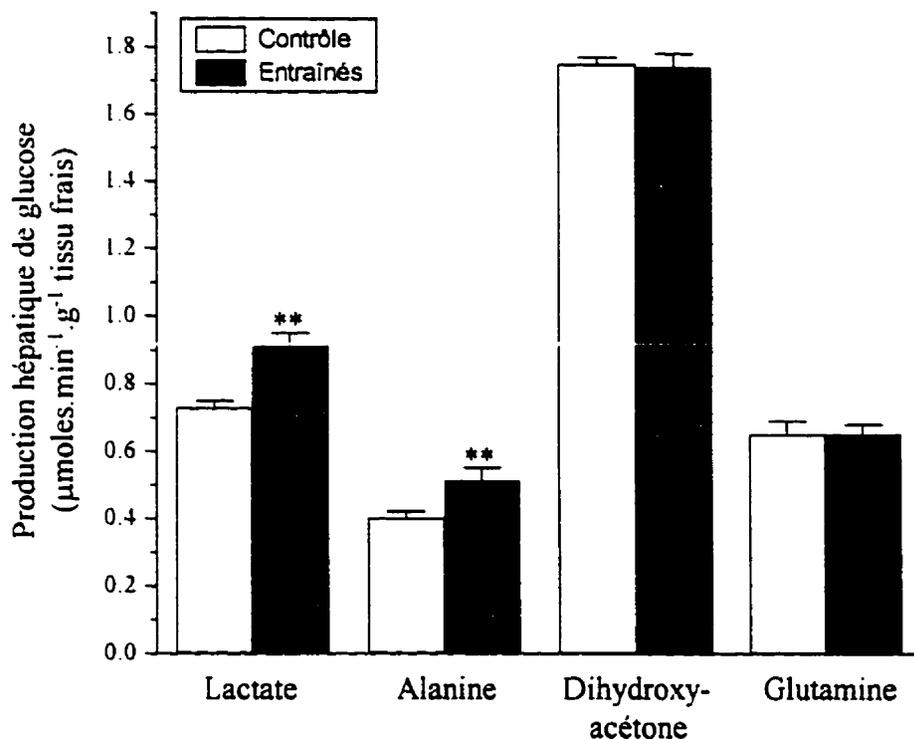


Figure 36: Effet de l'entraînement en endurance sur la capacité néoglucogénique chez le Rat. Les données sont extraites de l'article des études de Sumida et al. [1993] et Sumida et Donovan [1995], qui ont utilisé un modèle de foie perfusé *in situ* pour mesurer la néoglucogenèse à partir du lactate (2 mM), de l'alanine (10 mM), du dihydroxy-acétone (20 mM) et de la glutamine (10 mM) chez des rats sédentaires (contrôles) et entraînés (90 min de tapis roulant, 30 m/min, 10% grade, 5 jours/sem., 8-12 sem.) à jeun de 24 h. ** : différent du groupe contrôle, $P \leq 0,05$.

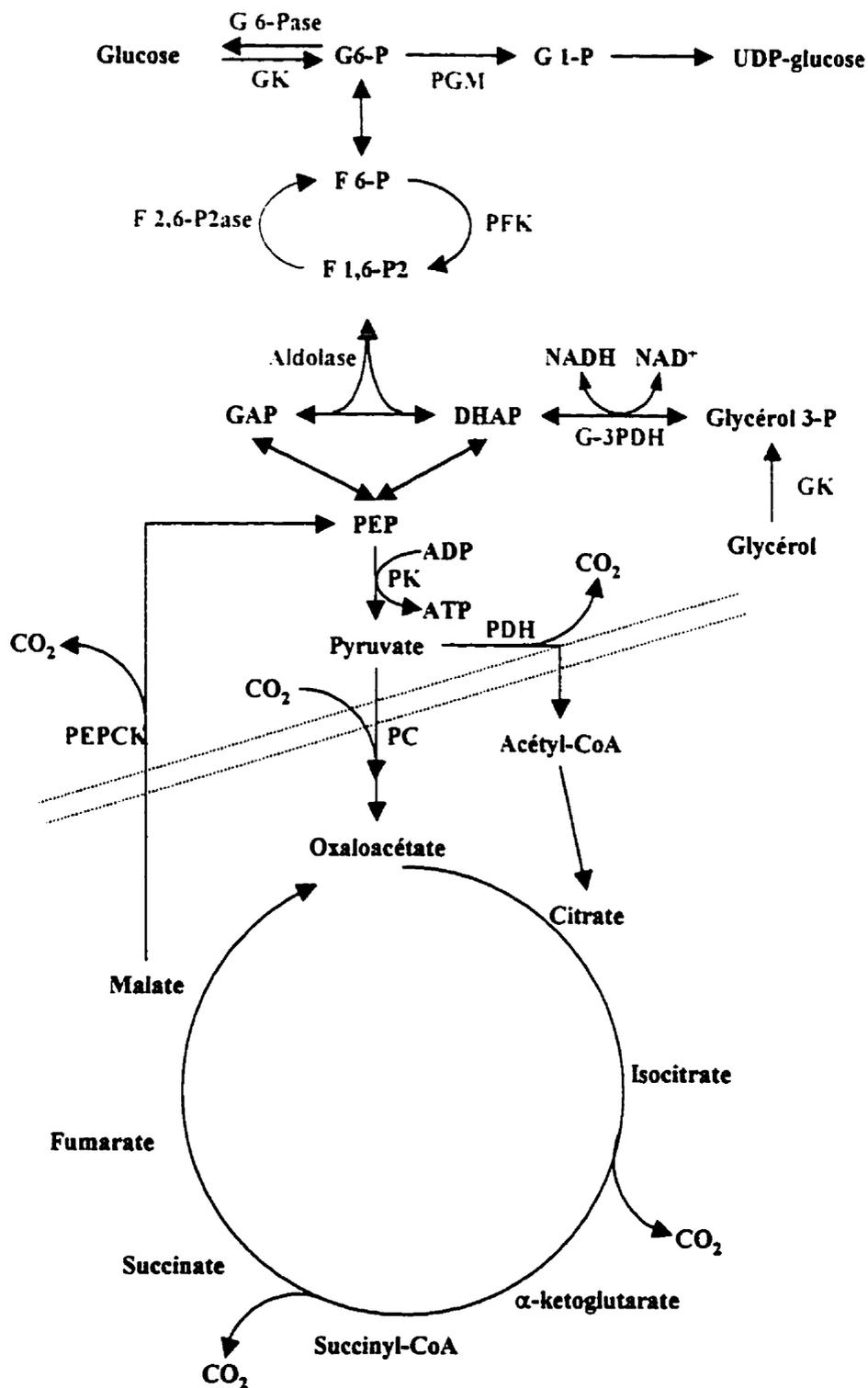


Figure 37: Voie de la néoglucogénèse. G6-Pase: glucose 6-phosphatase, HK: hexokinase, PGM: phosphoglucomutase, PFK:phosphofructokinase; F1,6-P2ase: fructose 1,6 biphosphatase, G3-PDH: glycéról 3-phosphate deshydrogénase, GK: glycéról kinase, PK: pyruvate kinase, PC: pyruvate carboxylase, PDH: pyruvate deshydrogénase, PEPCCK: phosphoenol-pyruvate carboxykinase

de l'activité de l'aspartate transaminase, mais aucune modification de l'activité de l'alanine transaminase. Une baisse de l'activité de la lactate déshydrogénase [Sumida et al., 1995; Winder, 1985] ainsi que de la phosphodiesterase [Dohm et al., 1976] a également été rapportée. Dans l'ensemble, bien que plusieurs études aient montré que l'entraînement modifie l'activité d'une variété d'enzymes hépatiques, il demeure difficile de cerner les mécanismes intracellulaires qui sont à l'origine de l'augmentation de la capacité néoglucogénique à la suite d'un entraînement.

Des informations plus claires sont cependant disponibles en ce qui concerne les mécanismes par lesquels l'entraînement affecte la régulation hormonale de la néoglucogénèse. En effet Podolin et al. [1994] ont montré que l'entraînement en endurance augmentait la sensibilité hépatique à la noradrénaline. Dans cette étude, des tranches de foies de rats entraînés et sédentaires provenant de trois groupes d'âge différents (4, 12 et 22 mois) ont été incubées en présence de lactate et de concentrations croissantes de noradrénaline. Les résultats ont montré que dans tous les groupes d'âges, la noradrénaline stimulait la néoglucogénèse de façon plus importante chez les rats entraînés (Figure 38). Podolin et al. [1996] ont utilisé la même approche expérimentale pour étudier les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la sensibilité hépatique à la noradrénaline induite par l'entraînement. Ces auteurs ont montré que l'accroissement de la sensibilité de la voie néoglucogénique à la noradrénaline en réponse à l'entraînement était mimée par un α -agoniste (la phényléphrine), alors que l'isoprotérénol (un β -agoniste) était sans effet. Cette étude a également montré que l'entraînement était associé à un accroissement de la sensibilité au glucagon (Figure 39).

Les deux études de Podolin et al. [1996; 1994] sont intéressantes parce qu'elles apportent une explication au fait que la production hépatique de glucose par la néoglucogénèse soit accrue par l'entraînement chez le Rat à l'exercice, bien que la réponse hormonale observée soit défavorable à la néoglucogénèse. En effet, tout comme chez l'Homme, l'entraînement chez le Rat est associé à une moindre diminution de la concentration d'insuline et à une moindre hausse de la concentration du glucagon et des catécholamines en réponse à l'exercice [Winder et al., 1982] (Figure 40). Chez les rats

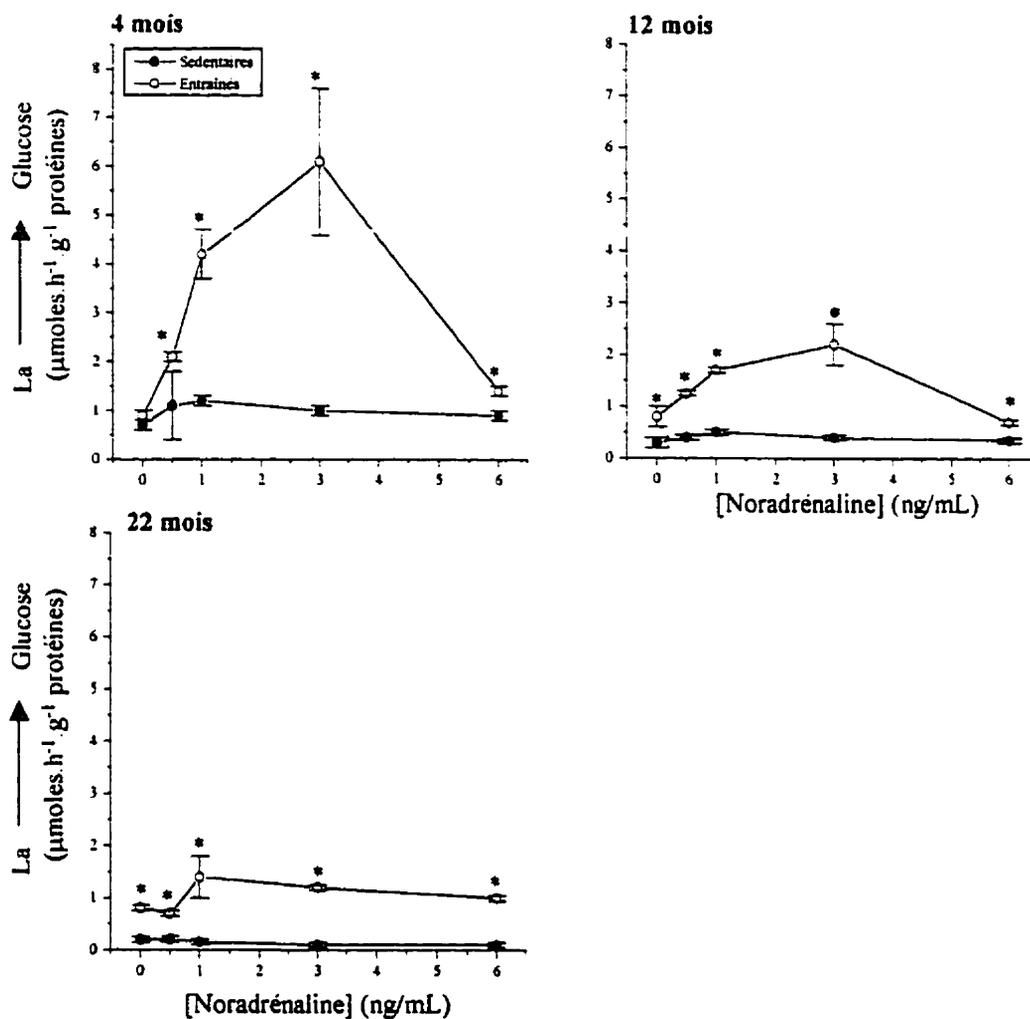


Figure 38: Effet de l'entraînement sur la néoglucogénèse à partir du lactate lorsque stimulée par la noradrénaline chez des rats provenant de différents groupes d'âges. Les données sont extraites de l'étude de Podolin et al. [1994]. Dans cette étude, des tranches de foie provenant de rats sédentaires et entraînés (60 min de tapis roulant, 75 % VO_2 max, 5 jours/sem., 10 sem.) âgés de 4, 12 et 22 mois ont été incubés pendant 2 h dans une solution Ringer (gazée avec 95 % O_2 , 5 % CO_2 , 37 °C), en présence de L-[U- $^{14}C_3$]-lactate (0,3 μ Ci), de glucagon (10^{-7} M), d'insuline (10^{-7} M), de lactate (4 mM) et d'adrénaline (0,25 ng/mL). Les concentrations de noradrénaline additionnées étaient de 0, 0,5, 1,0, 3,0, ou 6,0 ng/mL. * : différent du groupe sédentaire, $P \leq 0,05$.

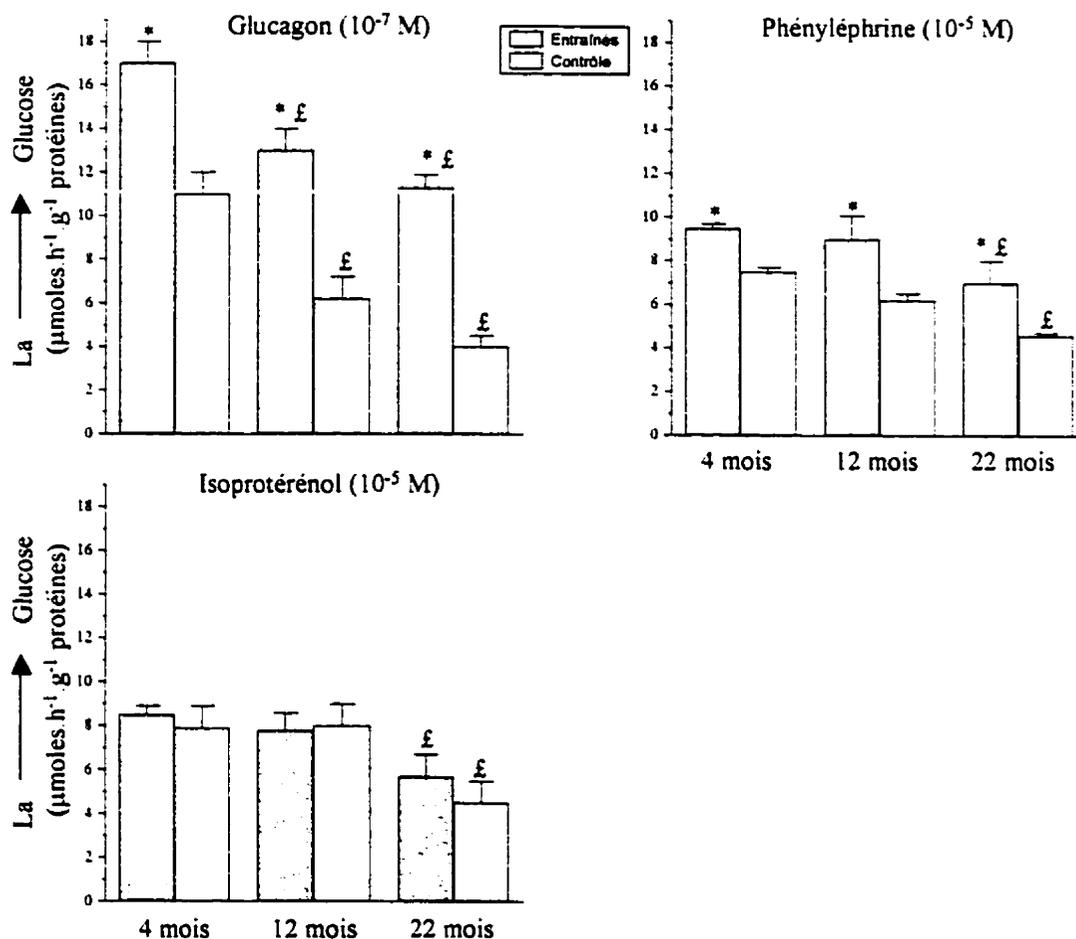


Figure 39: Effet de l'entraînement sur la néoglucogénèse à partir du lactate lorsque stimulée par le glucagon, la phényléphrine et l'isoprotérénol chez des rats provenant de différents groupes d'âges. Les données sont extraites de l'étude de Podolin et al. [1996]. Dans cette étude, des tranches de foie provenant de rats sédentaires (Contrôles) et entraînés (60 min de tapis roulant, 75 % VO₂max, 5 jours/sem. pendant 10 sem.), âgés de 4, 12 et 22 mois ont été incubés pendant 2 h. dans une solution Ringer (gazée avec 95 % O₂, 5 % CO₂, 37 °C) en présence de L-[U-¹⁴C₃]-lactate (0,3 µCi), d'insuline (10⁻⁷ M) et de lactate (4 mM). Des duplicatats ont été incubés dans les mêmes conditions mais en présence de glucagon (10⁻⁷ M), de phényléphrine (10⁻⁵ M) ou d'isoprotérénol (10⁻⁵ M). * : différent du groupe contrôle; £ : différent du groupe de 4 mois, P ≤ 0,05.

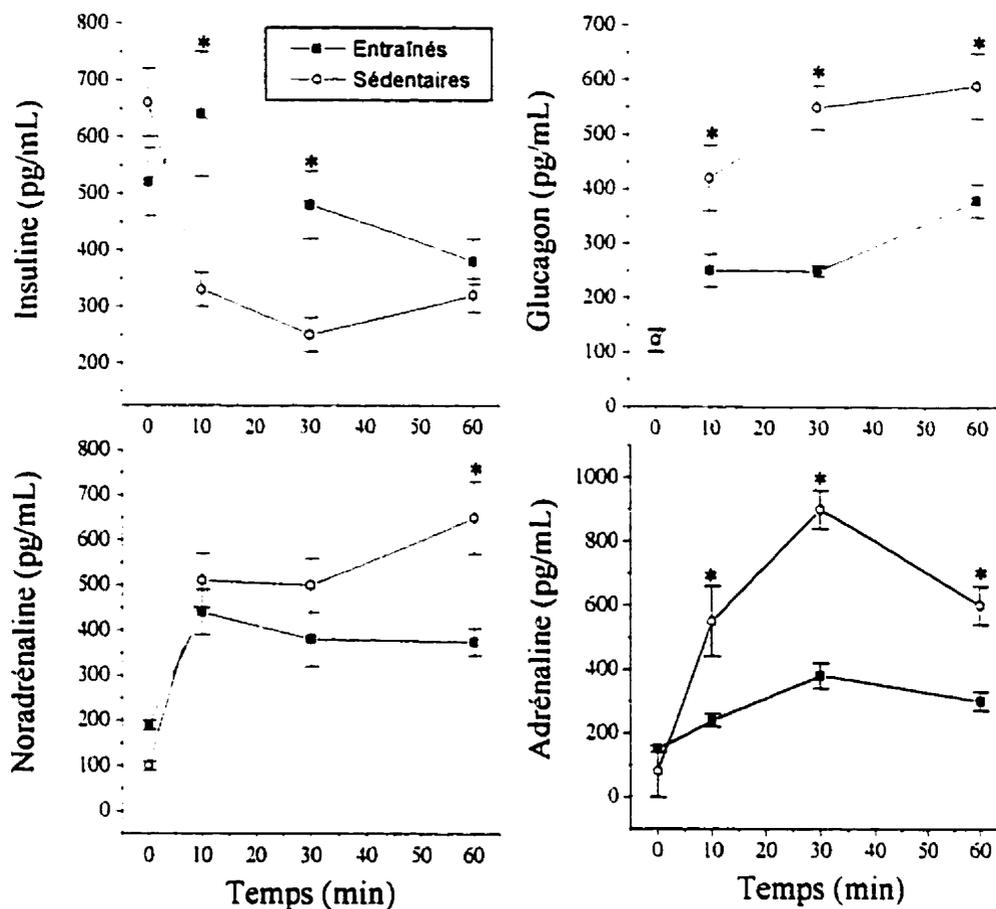


Figure 40: Effet de l'entraînement en endurance sur la réponse hormonale à l'exercice prolongé d'intensité modérée chez le Rat. Les données sont extraites de l'étude de Winder et al. [1982], dans laquelle des rats sédentaires et entraînés (jusqu'à 2 h de tapis roulant, 26 m/min, 15 % de pente, 5 jours/sem., 10 sem.) ont été soumis à un exercice de 60 min sur tapis roulant (21 m/min, 15 % de pente) après un jeûne de 24 h. * : différent du groupe sédentaire, $P \leq 0,05$.

entraînés, cette atténuation de la réponse hormonale est vraisemblablement compensée par une augmentation significative de la sensibilité hépatique aux hormones contre-régulatrices. Il n'est pas exclu qu'un phénomène du même genre soit observable chez l'Homme puisque Drouin et al. [1998] ont rapporté une sensibilité accrue au glucagon chez les sujets entraînés comparativement aux sujets sédentaires.

Dans l'ensemble, les études menées chez le Rat montrent que les adaptations du métabolisme du glucose circulant sont en partie différentes de celles observées chez l'Homme. Chez le Rat, le foie est clairement un organe qui s'adapte à l'entraînement en accroissant sa capacité néoglucogénique, ce qui se traduit par une production hépatique de glucose accrue et une consommation plus élevée de glucose par les tissus périphériques au cours de l'exercice. Encore une fois, il est important de signaler que cette adaptation a été observée au cours d'exercices effectués dans des conditions de jeûnes sévères. Chez l'Homme, l'entraînement a plutôt été associé à une diminution ou une absence de changement du taux de renouvellement du glucose circulant observée au cours de l'exercice. Quant à l'effet de l'entraînement sur la néoglucogénèse, les données de Bergman et al. [2000] sont en accord avec celles qui ont été obtenues chez le Rat. Cependant, d'autres études ont rapporté une diminution du flux néoglucogénique post-entraînement [Coggan et al., 1995; Friedlander et al., 1997]. Une des raisons pour lesquelles les études menées chez l'Homme n'ont pas rapporté d'augmentation systématique de la capacité néoglucogénique pourrait provenir du fait que les conditions expérimentales utilisées n'aient pas été suffisamment sévères pour que cette adaptation soit visible.

.5 Bibliographie

- Abumrad, N. N., A. D. Cherrington, P. E. Williams, W. W. Lacy, and D. Rabin.** Absorption and disposition of a glucose load in the conscious dog. *Am. J. Physiol.*, 242: E398-E406, 1982.
- Adopo, E., F. Péronnet, D. Massicotte, G. R. Brisson, and C. Hillaire-Marcel.** Respective oxidation of exogenous glucose and fructose given in the same drink during exercise. *J. Appl. Physiol.*, 76: 1014-19, 1994.
- Adopo, E.** *Contribution à l'étude de l'oxydation de glucides exogènes au cours de l'exercice par traçage au ¹³C.* Thèse présentée à la Faculté des études Supérieures en vue de l'obtention du grade de Philosophia Doctor, 1993.
- Ahlborg, G., and O. Björkman.** Splanchnic and muscle fructose metabolism during and after exercise. *J. Appl. Physiol.*, 69 (4): 1244-1251, 1990.
- Ahlborg, G., J. Wahren, and P. Felig.** Splanchnic and peripheral glucose and lactate metabolism during and after prolonged arm exercise. *J. Clin. Invest.*, 77: 690-699, 1986.
- Ahlborg, G., and P. Felig.** Lactate and glucose exchange across the forearm, legs, and splanchnic bed during and after prolonged leg exercise. *J. Clin. Invest.*, 69: 45-54, 1982.
- Ahlborg, G., and P. Felig.** Substrate utilization during prolonged exercise preceded by ingestion of glucose. *Am. J. Physiol.*, 233: E188-E194, 1977.
- Ahlborg, G., P. Felig, L. Hagenfeldt, R. Hendler, and J. Wahren.** Splanchnic and leg metabolism of glucose, free fatty acids, and amino acids. *J. Clin. Invest.*, 53: 1080-1090, 1974.
- Argaud, D., H. Roth, N. Wiernsperger, and X. M. Lerverve.** Metformin decreases gluconeogenesis by enhancing the pyruvate kinase flux in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.*, 213: 1341-1348, 1993.
- Argaud, D., S. Halimi, F. Catelloni, and X. M. Lerverve.** Inhibition of gluconeogenesis in isolated hepatocytes after chronic treatment with phenobarbital. *Biochem. J.*, 280: 663-669, 1991.
- Berger, C. M., P. J. Sharis, D. P. Bracy, D. B. Lacy, and D. H. Wasserman.** Sensitivity of exercise-induced increase in hepatic glucose production to glucose supply and demand. *Am. J. Physiol.*, 267: E411-E421, 1994.

- Bergman, B. C., M. A. Horning, G. A. Casazza, E. E. Wolfel, G. E. Butterfield, and G. A. Brooks.** Endurance training increases gluconeogenesis during rest and exercise in men. *Am. J. Physiol.*, 278: E244-E251, 2000.
- Bergman, B. C., G. E. Butterfield, E. E. Wolfel, G. D. Lopaschuk, G. A. Casazza, M. A. Horning, and G. A. Brooks.** Muscle net glucose uptake and glucose kinetics after endurance training in men. *Am. J. Physiol.*, 277: E81-E92, 1999.
- Bergman, B. C., G. E. Butterfield, E. E. Wolfel, G. D. Lopaschuk, G. A. Casazza, M. A. Horning, and G. A. Brooks.** Active muscle and whole body lactate kinetics after endurance training in men. *J. Appl. Physiol.*, 87: 1684-1696, 1999a.
- Biolo, G., K. D. Tipton, S. Klein, and R.R. Wolfe.** An abundant supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein. *Am. J. Physiol.*, 273: E122-129, 1997.
- Björkman, O., L. S. Eriksson, B. Nyberg, and J. Wahren.** Gut exchange of glucose and lactate in basal state and after oral glucose ingestion in postoperative patients. *Diabetes*, 39: 747-751, 1990.
- Björkman, O., and L. S. Eriksson.** Splanchnic glucose metabolism during leg exercise in 60-hour-fasted human subjects. *Am. J. Physiol.*, 245: E443-E448, 1983.
- Björkman, O., P. Felig, L. Hagenfeldt, and J. Wahren.** Influence of hypoglucagonemia on splanchnic glucose output during leg exercise in man. *Clinical Physiology*, 1: 43-57, 1981.
- Bloom, S. R., R. H. Johnson, D. M. Park, M. J. Rennie, and W. R. Sulaiman.** Differences in the metabolic and hormonal response to exercise between racing cyclists and untrained individuals. *J. Physiol. (Lond)* 258:1-18, 1976.
- Bobyleva-Guarriero, V., and H. A. Lardy.** The effect of different types of physical exercise on glucose and citrulline synthesis in isolated rat liver parenchymal cells. *FEBS Lett.*, 194: 56-59, 1986.
- Bougneres, P. F., F. Rocchiccioli, N. Nurjhan, and J. Zeller.** Stable isotope determination of plasma lactate conversion into glucose in fasting infants. *Am. J. Physiol.*, 268: E652-E659, 1995.
- Brooks, G. A., and J. Mercier.** Balance of carbohydrate and fat utilization during exercise: the "crossover" concept. *J. Appl. Physiol.*, 76: 2253-2261, 1994.

- Brooks, G. A.** The lactate shuttle during exercise and recovery. *Med. Sci. Sports Exercise*, 18: 360-368, 1986.
- Brooks, G. A., and C. M. Donovan.** Effect of endurance training on glucose kinetics during exercise. *Am. J. Physiol.*, 244 (Endocrinol. Metab. 7): E505-512, 1983.
- Brunengraber, H., J. K. Kelleher, and Ch. Des Rosiers.** Applications of mass isotopomer analysis to nutrition research. *Annu. Rev. Nutr.*, 17: 559-596, 1997.
- Chandramouli, V., K. Ekberg, W. C. Schumann, S. C. Kalhan, J. Wahren, and B. R. Landau.** Quantifying gluconeogenesis during fasting. *Am. J. Physiol.*, 273 (Endocrinol. Metabol. 36): E1209-E1215, 1997.
- Chiasson, J.-L., G. G. El Achkar, F. Ducros, J. Bourque, and P. Maheux.** Glucose turnover and gluconeogenesis during pregnancy in women with and without insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin. Invest. Med.*, 20: 140-151, 1997.
- Chiasson, J.-L., R. L. Atkinson, A. D. Cherrington, U. Keller, B. C. Sinclair-Smith, W. W. Lacy, and J. E. Liljenquist.** Effects of insulin at two dose levels on gluconeogenesis from alanine in fasting man. *Metabolism*, 29: 810-818, 1980.
- Chiasson, J.-L., J. E. Liljenquist, W. W. Lacy, A. S. Jennings, and A. D. Cherrington.** Gluconeogenesis : Methodological approaches in Vivo. *Federation Proc.*, 36: 229-235, 1977.
- Chiasson, J.-L., J. E. Liljenquist, B. C. Sinclair-Smith, and W. W. Lacy.** Gluconeogenesis from alanine in normal postabsorptive man. Intrahepatic stimulatory effect of glucagon. *Diabetes*, 24: 574-584, 1975.
- Coggan, A. R., G. A. Brooks, and A. L. Friedlander.** Letters to the Editor. *J. Appl. Physiol.*, 84: 1480-1482, 1998.
- Coggan, A. R.** Plasma glucose metabolism during exercise: Effect of endurance training in humans. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 29: 620-627, 1997.
- Coggan, A. R., S. C. Swanson, L. A. Mendenhall, D. L. Habash, and C. L. Kien.** Effect of endurance training on hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during prolonged exercise in men. *Am. J. Physiol.*, 268 (Endocrinol. Metab. 31): E375-E383, 1995.

- Coggan, A. R., C. A. Raguso, B. D. Williams, L. S. Sidossis, and A. Gastaldelli.** Glucose kinetics during high-intensity exercise in endurance-trained and untrained humans. *J. Appl. Physiol.*, 78: 1203-1207, 1995a.
- Coggan, A. R., and B. D. Williams.** *Metabolic adaptations to endurance training: Substrate metabolism during exercise.* In Exercise Metabolism, M. Hargreaves Editor, Human Kinetics, Champaign, IL., p 197. 1995.
- Coggan, A. R., and E. F. Coyle.** Carbohydrate ingestion during prolonged exercise: effects on metabolism and performance. *Exerc. Sport Sci. Rev.*, 19: 1-40, 1991.
- Coggan, A. R., W. M. Kohrt, R. J. Spina, D. M. Bier, and J. O. Holloszy.** Endurance training decreases plasma glucose turnover and oxidation during moderate-intensity exercise in men. *J. Appl. Physiol.*, 68: 990-996, 1990.
- Cohen, S. M.** Simultaneous ^{13}C and ^{31}P NMR studies of perfused rat liver. Effects of insulin and glucagon and a ^{13}C NMR assay of free Mg^{2+} . *J. Biol. Chem.*, 258: 14294-308, 1983.
- Consoli, A., N. Nurjhan, F. Capani, T. Pangburn, D. Lapenna, and J. Gerich.** Limitations in the use of $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ acetate for measuring gluconeogenesis in Vivo. *Diabetes*, 42: 732-737, 1993.
- Consoli, A., N. Nurjhan, J. J. Reilly Jr., D. M. Bier, and J. E. Gerich.** Contribution of liver and skeletal muscle to alanine and lactate metabolism in humans. *Am. J. Physiol.*, 259 (Endocrinol. Metab. 22): E677-E684, 1990.
- Consoli, A., N. Nurjhan, J. J. Reilly Jr., D. M. Bier, and J. E. Gerich.** Mechanism of increased gluconeogenesis in noninsulin-dependent diabetes mellitus. Role of alterations in systemic, hepatic, and muscle lactate and alanine metabolism. *J. Clin. Invest.*, 86: 2038-2045, 1990a.
- Consoli, A., N. Nurjhan, F. Capani, and J. Gerich.** Predominant role of gluconeogenesis in increased hepatic glucose production in NIDDM. *Diabetes*, 38: 550-557, 1989.
- Consoli, A., F. Kennedy, J. Miles, and J. Gerich.** Determination of Krebs Cycle metabolic carbon exchange in Vivo and its use to estimate the individual contributions. *J. Clin. Invest.*, 80: 1303-1310, 1987.

- Dekker, E., M. K. Hellerstein, J. A. Romijn, R. A. Neese, N. Peshu, E. Endert, K. Marsh, and H. P. Sauerwein.** Glucose homeostasis in children with falciparum malaria : Precursor supply limits gluconeogenesis and glucose production. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82: 2514-2521, 1997.
- Dela F.** On the influence of physical training on glucose homeostasis. *Acta. Physiol. Scand.*, 635:1-41,1996.
- Des Rosiers, Ch., L. Di Donato, B. Comte, A. Laplante, C. Marcoux, F. David, C. A. Fernandez, and H. Brunengraber.** Isotopomer analysis of Citric Acid Cycle and gluconeogenesis in rat liver. Reversibility of isocitrate dehydrogenase and involvement of ATP-citrate lyase in gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.*, 270: 10027-10036, 1995.
- Deuster, P. A, G. P. Chrousos, A. Luger, J. E. DeBolt, L. L. Bernier, U. H. Trostmann, S. B. Kyle, L. C. Montgomery, and D. L. Loriaux.** Hormonal and metabolic responses of untrained, moderately trained, and highly trained men to three exercise intensities. *Metabolism* 38: 141-148, 1989.
- Di Donato, L., Ch. Des Rosiers, J. A. Montgomery, F. David, M. Garneau, and H. Brunengraber.** Rates of gluconeogenesis and Citric Acid Cycle in perfused livers, assessed from the Mass Spectrometric assay of the ¹³C labeling pattern of glutamate. *J. Biol. Chem.*, 268: 4170-4180, 1993.
- Diraison, F., V. Large, H. Brunengraber, and M. Beylot.** Non-invasive tracing of liver intermediary metabolism in normal subjects and in moderately hyperglycaemic NIDDM subjects. Evidence against increased gluconeogenesis and hepatic fatty acid oxidation in NIDDM. *Diabetologia*, 41: 212-220, 1998.
- Dohm, G. L., S. N. Pennington, and H. Barakat.** Effect of exercise training on adenyl cyclase and phosphodiesterase in skeletal muscle, heart, and liver. *Biochem. Med.* 16: 138-142, 1976.
- Donovan, C. M., and K. D. Sumida.** Training enhanced hepatic gluconeogenesis: The importance for glucose homeostasis during exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 29: 628-634, 1997.
- Donovan, C. M., and M. J. Pagliassotti.** Enhanced efficiency of lactate removal after endurance training. *J. Appl. Physiol.*, 68: 1053-1058, 1990.

- Donovan, C. M., and F. D. Sumida.** Training improves glucose homeostasis in rats during exercise via glucose production. *Am. J. Physiol.*, 258 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 27): R770-R776, 1990.
- Donovan, C. M., and M. J. Pagliassotti.** Endurance training enhances lactate clearance during hyperlactatemia. *Am. J. Physiol.*, 257 (Endocrinol. Metab. 20): E782-E789, 1989.
- Donovan, C. M., and G. A. Brooks.** Endurance training affects lactate clearance, not lactate production. *Am. J. Physiol.*, 244 (Endocrinol. Metab. 7): E83-E92, 1983.
- Drouin, R., C. Lavoie, J. Bourque, F. Ducros, D. Poisson, and J.-L. Chiasson.** Increased hepatic glucose production response to glucagon in trained subjects. *Am. J. Physiol.*, 274 (Endocrinol. Metab. 37): E23-E28, 1998.
- Esenmo, E., V. Chandramouli, W. C. Schumann, K. Kumaran, J. Wahren, and B. R. Landau.** Use of $^{14}\text{CO}_2$ in estimating rates of hepatic gluconeogenesis. *Am. J. Physiol.*, 263: E36-E41, 1992.
- Exton, J. H., and C. R. Park.** Control of gluconeogenesis in liver. General features of gluconeogenesis in the perfused livers of rats. *J. Biol. Chem.*, 242: 2622-2636, 1967.
- Fahey, T. D., J. D. Larsen, G. A. Brooks, W. Colvin, S. Henderson, and D. Lary.** The effect of ingesting polylactate or glucose polymer drinks during prolonged exercise. *Int. J. Sport Nutr.*, 1: 249-256, 1991.
- Friedlander, A. L., G. A. Casazza, M. A. Horning, M. J. Huie, and G. A. Brooks.** Training alterations of glucose flux in men. *J. Appl. Physiol.*, 82: 1360-1369, 1997.
- Friedman, B., E. H. Goodman Jr., H. L. Saunders, V. Kostos, and S. Weinhouse.** Estimation of pyruvate recycling during gluconeogenesis in perfused rat liver. *Metabolism*, 20: 2-12, 1971.
- Gay, L.-J., Y. Schutz, V. Di Vetta, P. Schneiter, L. Tappy, and E. Jequier.** Measurement of $^{13}\text{CO}_2$ in expired air as an index of compliance to high carbohydrate diet naturally enriched in ^{13}C . *International Journal of Obesity*, 18: 591-595, 1994.
- Gay, L.-J., P. Schneiter, Y. Schutz, V. Di Vetta, E. Jequier, and L. Tappy.** A non-invasive assessment of hepatic glycogen kinetics and post-absorptive gluconeogenesis in man. *Diabetologia*, 37: 517-523, 1994a.
- Gleeson, T. T.** Post-Exercise lactate metabolism: A comparative review of sites, pathways, and regulation. *Annu. Rev. Physiol.*, 58: 565-581, 1996.

- Green, H. J., G. Coates, J. R. Sutton, and S. Jones.** Early adaptations in gas exchange, cardiac function and haematology to prolonged exercise training in man. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 63: 17-23, 1991.
- Green, H. J., L. L. Jones, M. E. Houston, M. E. Ball-Burnett, and B. W. Farrance.** Muscle energetics during prolonged cycling after exercise hypervolemia. *J. Appl. Physiol.*, 66: 622-631, 1989.
- Gruetter, R., T. A. Prolla, and R. G. Shulman.** ^{13}C NMR visibility of rabbit muscle glycogen in vivo. *Magn. Reson. Med.*, 20: 327-332, 1991.
- Grunnet, N., and J. Katz.** Effects of ammonia and norvaline on lactate metabolism by hepatocytes from starved rats. The use of ^{14}C -labelled lactate in studies of hepatic gluconeogenesis. *Biochem. J.*, 172: 595-603, 1978.
- Guezennec, C. Y., P. Satabin, F. Duforez, D. Merino, F. Péronnet, and J. Koziat.** Oxidation of corn starch, glucose, and fructose ingested before exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 21: 45-50, 1989.
- Guo, Z.-K., W.-N. Lee, J. Katz, and A. E. Bergner.** Quantitation of positional isomers of deuterium-labeled glucose by gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 204: 273-282, 1992.
- Gyntelberg, F., M. J. Rennie, R. C. Hickson, and J. O. Holloszy.** Effect of training on the response of plasma glucagon to exercise. *J. Appl. Physiol.*, 43: 302-305, 1977.
- Hartley, L. H., J. W. Mason, R. P. Hogan, L. G. Jones, T. A. Kotchen, E. H. Mougey, F. E. Wherry, L. L. Pennington, and P. T. Ricketts.** Multiple hormonal responses to prolonged exercise in relation to physical training. *J. Appl. Physiol.*, 33: 607-10, 1972.
- Hartley, L. H., J. W. Mason, R. P. Hogan, L. G. Jones, T. A. Kotchen, E. H. Mougey, F. E. Wherry, L. L. Pennington, and P. T. Ricketts.** Multiple hormonal responses to graded exercise in relation to physical training. *J. Appl. Physiol.*, 33: 602-606, 1972a.
- Hawley, J. A., S. C. Dennis, and T. D. Noakes.** Oxidation of carbohydrate ingested during prolonged endurance exercise. *Sports. Med.*, 14: 27-42, 1992.

- Hellerstein, M. K., R. A. Neese, P. Linfoot, M. Christiansen, S. Turner, and A. Letscher.** Hepatic gluconeogenic fluxes and glycogen turnover during fasting in humans. A stable isotope study. *J. Clin. Invest.*, 100: 1305-1319, 1997.
- Hellerstein, M. K., R. A. Neese, J-M. Schwarz, S. Turner, D. Faix, and K. Wu.** Altered fluxes responsible for reduced hepatic glucose production and gluconeogenesis by exogenous glucose in rats. *Am. J. Physiol.*, 272 (Endocrinol. Metabol. 35): E163-E172, 1997a.
- Hellerstein, M. K., and R. A. Neese.** Mass isotopomer distribution analysis: a technique for measuring biosynthesis and turnover of polymers. *Am. J. Physiol.*, 263 (Endocrinol. Metabol. 26): E988-E1001, 1992.
- Hetenyi Jr., G., and C. Ferrarotto.** Correction for metabolic exchange in the calculation of the rate of gluconeogenesis in rats. *Biochemical Medicine*, 29: 372-378, 1983.
- Hetenyi Jr., G.** Correction for the metabolic exchange of ^{14}C for ^{12}C atoms in the pathway of gluconeogenesis in Vivo. *Federation Proc.*, 41: 104-109, 1982.
- Hetenyi Jr., G., R. A. Layberry, D. M. Foster, and M. Berman.** Transfer of carbon atoms among circulating glucose, alanine, and lactate in pancreatectomized dogs. *Am. J. Physiol.*, 239 (Endocrinol. Metab. 2): E39-E44, 1980.
- Hetenyi Jr., G.** Correction factor for the estimation of plasma glucose synthesis from the transfer of ^{14}C -atoms from labelled substrate in Vivo : A preliminary report. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 57: 767-770, 1979.
- Holloszy, J. O., and E. F. Coyle.** Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J. Appl. Physiol.*, 56: 831-838, 1984.
- Horn, D. B., D. A. Podolin, J. E. Friedman, D. A. Scholnick, and R. S. Mazzeo.** Alterations in key gluconeogenic regulators with age and endurance training. *Metabolism*, 46: 414-419, 1997.
- Hultman, E., and L. H. Nilsson: son.** Liver glycogen in man. Effect of different diets and muscular exercise. pp.143-151 in Pernow, B. & Saltin, B. (eds). *Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. IX.* Plenum press, London, 1971.

- Huston, R. L., P. C. Weiser, G. L. Dohm, E. W. Askew, and J. B. Boyd.** Effects of training, exercise and diet on muscle glycolysis and liver gluconeogenesis. *Life Sci.*, 17: 369-376, 1975.
- Hwang, J-H., G. Perseghin, D. L. Rothman, G. W. Cline, I. Magnusson, F. F. Petersen, and G. I. Shulman.** Impaired net hepatic glycogen synthesis in insulin-dependant diabetic subjects during mixed meal ingestion. A ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Study. *J. Clin. Invest.*, 95: 783-787, 1995.
- James, M. O, R. L. Smith, R. T. Williams, and M. Reidenberg.** The conjugation of phenylacetic acid in man, sub-human primates and some non-primate species. *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.*, 182: 25-35, 1972 .
- Ji, L. L., D. L. Lennon, R. G. Kochan, F. J. Nagle, and H. A. Lardy.** Enzymatic adaptation to physical training under beta-blockade in the rat. Evidence of a beta 2-adrenergic mechanism in skeletal muscle. *J. Clin. Invest.*, 78: 771-778, 1986.
- John-Alder, H. B., R. M. McAllister, and R. L. Terjung.** Reduced running endurance in gluconeogenesis-inhibited rats. *Am. J. Physiol.*, 251 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 20): R137-R142, 1986.
- Johnson, J. L., and G. J. Bagby.** Gluconeogenic pathway in liver and muscle glycogen synthesis after exercise. *J. Appl. Physiol.*, 64: 1591-1599, 1988.
- Jungermann, K., and T. Kietzmann.** Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu. Rev. Nutr.*, 16: 179-203, 1996.
- Kalhan, S., K. Rossi, L. Gruca, E. Burkett, and A. O'Brien.** Glucose turnover and gluconeogenesis in human pregnancy. *J. Clin. Invest.*, 100: 1775-1781, 1997.
- Karlander, S., A. Roovete, M. Vranic, and S. Efendic.** Glucose and fructose-6-P cycle in humans. *Am. J. Physiol.*, 251: E530-E536, 1986.
- Katz, J., and J. A. Tayek.** Gluconeogenesis and the Cori cycle in 12-, 20-, and 40-h-fasted humans. *Am. J. Physiol.*, 275 (Endocrinol. Metab. 38): E537-E542, 1998.
- Katz, J., P. A. Wals, and W. N. Paul Lee.** Determination of pathways of glycogen synthesis and the dilution of the three-carbon pool with $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 2103-2107, 1991.
- Katz, J., P. A. Wals, E. A. Bergner, and W. N. P. Lee.** Alfred Benson Symposium 30, eds. Quistorff, B. and Grunnet, N. (Munksgaard, Copenhagen), 1990.

- Katz, J., W. N. Lee, P. A. Wals, and E. A. Bergner.** Studies of glycogen synthesis and the Krebs cycle by mass isotopomer analysis with [U-¹³C]glucose in rats. *J. Biol. Chem.*, 264: 12994-13004, 1989.
- Katz, J.** Determination of gluconeogenesis in Vivo with ¹⁴C-labeled substrates. *Am. J. Physiol.*, 248 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 17): R391-R399, 1985.
- Katz, J., and I. L. Chaikoff.** Synthesis via the Krebs: Cycle in the utilization of acetate by rat liver slices. *Biochim. Biophys. Acta*, 18: 87-101, 1955.
- Kelleher, J. K., and T. M. Masterson.** Model equations for condensation biosynthesis using stable isotopes and radioisotopes. *Am. J. Physiol.*, 262: E118-E125, 1992.
- Kelleher, J. K.** Gluconeogenesis from labeled carbon : estimating isotope dilution. *Am. J. Physiol.*, 250 (Endocrinol. Metab. 13): E296-E305, 1986.
- Kelleher, J. K.** Analysis of tricarboxylic acid cycle using [¹⁴C]citrate specific activity ratios. *Am. J. Physiol.*, 248 (Endocrinol. Metab. 11): E252-E260, 1985.
- Kelley, D. E., M. Mokan, J. A. Simoneau, and L. J. Madarino.** Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle. *J. Clin. Invest.*, 92: 91-98, 1993.
- Kjær, M.** *Hepatic fuel metabolism during exercise.* In Exercise Metabolism, M. Hargreaves Editor, Human Kinetics, Champaign, IL., p 73. 1995.
- Kjær, M., P. A. Farrell, N. J. Christensen, and H. Galbo.** Increased epinephrine response and inaccurate glucoregulation in exercising athletes. *J. Appl. Physiol.*, 61: 1693-1700, 1986.
- Koivisto, V., R. Hendler, E. Nadel, and P. Felig.** Influence of physical training on the fuel-hormone response to prolonged intensity exercise. *Metabolism*, 31: 192-197, 1982.
- Kraus, H., and R. Kirsten.** Die wirkung von körperlichem auf mitochondriale Energie Produktion im Hermskelder Leber. *Pflügers Arch.*, 320: 334-347, 1970.
- Kuwajima, M., S. Golden, J. Katz, R. H. Unger, D. W. Foster, and J. D. McGarry.** Active hepatic glycogen synthesis from gluconeogenic precursors despite high tissue levels of fructose 2,6-biphosphate. *J. Biol. Chem.*, 261: 2632-2637, 1986.

- Landau, B. R., J. Wahren, K. Ekberg, S. F. Previs, D. Yang, and H. Brunengraber.** Limitations in estimating gluconeogenesis and Cori cycling from mass isotopomer distributions using [U-¹³C₆] glucose. *Am. J. Physiol.*, 274 (Endocrinol. Metab. 37): E954-E961, 1998.
- Landau, B. R., J. Wahren, V. Chandramouli, W. C. Schumann, K. Ekberg, and S. C. Kalhan.** Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. *J. Clin. Invest.*, 98: 378-385, 1996.
- Landau, B. R., J. Wahren, S. F. Previs, K. Ekberg, V. Chandramouli, and H. Brunengraber.** Glycerol production and utilization in humans : sites and quantitation. *Am. J. Physiol.*, 271: E1110-1117, 1996a.
- Landau, B. R., V. Chandramouli, W. C. Schumann, K. Ekberg, K. Kumaran, S. C. Kalhan, and J. Wahren.** Estimates of Krebs cycle activity and contributions of gluconeogenesis to hepatic glucose production in fasting healthy subjects and IDDM patients. *Diabetologia*, 38: 831-838, 1995.
- Landau, B. R., C. A. Fernandez, S. F. Previs, K. Ekberg, V. Chandramouli, J. Wahren, S. C. Kalhan, and H. Brunengraber.** A limitation in the use of mass isotopomer distributions to measure gluconeogenesis in fasting humans. *Am. J. Physiol.*, 269 (Endocrinol. Metabol. 32): E18-E26, 1995a.
- Landau, B. R., J. Wahren, V. Chandramouli, W. C. Schumann, K. Ekberg, and S. C. Kalhan.** Use of ²H₂O for estimating rates of gluconeogenesis. Application to the fasted state. *J. Clin. Invest.*, 95: 172-178, 1995b.
- Large, V., M. Soloviev, H. Brunengraber, and M. Beylot.** Lactate and pyruvate isotopic enrichments in plasma and tissues of postabsorptive and starved rats. *Am. J. Physiol.*, 268: E880-888, 1995.
- Lavoie, C., F. Ducros, J. Bourque, H. Langelier, and J.-L. Chiasson.** Glucose metabolism during exercise in man: The role of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glucose production and gluconeogenesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 75: 26-35, 1997.
- Leverve, X. M., A. K. Groen, A. J. Verhoeven, and J. M. Tager.** Kinetic analysis of short-term effects of alpha-agonists on gluconeogenesis in isolated hepatocytes. *FEBS Lett.*, 181: 43-46, 1985.

- Magnusson, I., D. L. Rothman, B. Jucker, G. W. Cline, R. G. Shulman, and G. I. Shulman.** Liver glycogen turnover in fed and fasted humans. *Am. J. Physiol.*, 266: E796-E803, 1994.
- Magnusson, I., D. L. Rothman, L. D. Katz, R. G. Shulman, and G. I. Shulman.** Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Study. *J. Clin. Invest.*, 90: 1323-1327, 1992.
- Magnusson, I., W. C. Schumann, G. E. Bartsch, V. Chandramouli, K. Kumaran, J. Wahren, and B. R. Landau.** Noninvasive tracing of Krebs Cycle metabolism in liver. *J. Biol. Chem.*, 266: 6975-6984, 1991.
- Magnusson, I., and G. I. Shulman** Pathways of hepatic glycogen synthesis in humans. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 23: 939-943, 1991a.
- Magnusson, I., A. Wennlund, V. Chandramouli, W. C. Schumann, K. Kumaran, J. Wahren, and B. R. Landau.** Fructose-6-phosphate cycling and the pentose cycle in hyperthyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 70: 461-466, 1990.
- Magnusson, I., V. Chandramouli, W. C. Schumann, K. Kumaran, J. Wahren, and B. R. Landau.** Pathways of hepatic glycogen formation in humans following ingestion of a glucose load in the fed state. *Metabolism*, 38: 583-585, 1989.
- Magnusson, I., V. Chandramouli, W. C. Schumann, K. Kumaran, J. Wahren, and B. R. Landau.** Quantitation of the pathways of hepatic glycogen formation on ingesting a glucose load. *J. Clin. Invest.*, 80: 1748-1754, 1987.
- Mæhlum, S., J. Jervell, and E. D. R. Pruet.** Arterial-hepatic vein glucose differences in normal and diabetic man after a glucose infusion at rest and after exercise. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 36: 415-422, 1976.
- Marliss, E. B., E. Simantirakis, P. D. G. Miles, R. Hunt, R. Gougeon, C. Purdon, J. B. Halter, and M. Vranic.** Glucose turnover and its regulation during intense exercise and recovery in normal male subjects. *Clin. Invest. Med.*, 15: 406-419, 1992.
- Massicotte, D., F. Péronnet, C. Tremblay, E. Bronsard, and C. Hillaire-Marcel.** Lack of effect of NaCl and/or metoclopramide on exogenous (^{13}C)-glucose oxidation during exercise. *Int. J. Sports Med.*, 17: 165-169, 1996.

- Massicotte, D., F. Péronnet, E. Adopo, G. R. Brisson, and C. Hillaire-Marcel.** Effect of metabolic rate on the oxidation of ingested glucose and fructose during exercise. *Int. J. Sports Med.*, 15: 177-180, 1994.
- Massicotte, D., S. Provencher, E. Adopo, F. Péronnet, G. R. Brisson, and C. Hillaire-Marcel.** Oxidation of ethanol at rest and during prolonged exercise in men. *J. Appl. Physiol.*, 75: 329-333, 1993.
- Massicotte, D., F. Péronnet, C. Pitre, E. Adopo, G. R. Brisson, and C. Hillaire-Marcel.** Exogenous ^{13}C glucose oxidation during exercise: North American vs Western European studies. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 67: 402-407, 1993a.
- Massicotte, D., F. Péronnet, E. Adopo, G. R. Brisson, and C. Hillaire-Marcel.** Metabolic availability of oral glucose during exercise: a reassessment. *Metabolism*, 41: 1284-90, 1992.
- Massicotte, D., F. Péronnet, G. R. Brisson, and C. Hillaire-Marcel.** Oxidation of exogenous medium-chain free fatty acids during prolonged exercise: comparison with glucose. *J. Appl. Physiol.*, 73:1334-39, 1992a.
- Massicotte, D., F. Péronnet, G. R. Brisson, L. Boivin, and C. Hillaire-Marcel.** Oxidation of exogenous carbohydrate during prolonged exercise in fed and fasted conditions. *Int. J. Sports Med.*, 11: 253-258, 1990.
- Massicotte, D., F. Péronnet, G. R. Brisson, K. Bakkouch, and C. Hillaire-Marcel.** Oxidation of a glucose polymer during exercise: comparison with glucose and fructose. *J. Appl. Physiol.*, 66: 179-183, 1989.
- Massicotte, D., F. Péronnet, C. Allah, C. Hillaire-Marcel, M. Ledoux, and G. R. Brisson.** Metabolic response to [^{13}C]glucose and [^{13}C]fructose ingestion during exercise. *J. Appl. Physiol.*, 61: 1180-84, 1986.
- Massicotte, D., C. Hillaire-Marcel, M. Ledoux, and F. Péronnet.** The natural isotope tracing with ^{13}C : a non-invasive method for studying the metabolism during exercise. *Can. J. Appl. Sport Sci.*, 9: 164, 1984.
- Mazzeo, R. S., G. A. Brooks, D. A. Schoeller, and T. F. Budinger.** Disposal of blood [$1\text{-}^{13}\text{C}$] lactate in humans during rest and exercise. *J. Appl. Physiol.*, 60: 232-241, 1986.
- McConell, G., S. Fabris, J. Proietto, and M. Hargreaves.** Effect of carbohydrate ingestion on glucose kinetics during exercise. *J. Appl. Physiol.*, 77: 1537-1541, 1994.

- McMahon, M., H. M. Marsh, and R. A. Rizza.** Effects of basal insulin supplementation on disposition of mixed meal in obese patients with NIDDM. *Diabetes*, 38: 291-303, 1989.
- Mendenhall, L. A., S. C. Swanson, D. L. Habash, and A. R. Coggan.** Ten days of exercise training reduces glucose production and utilization during moderate-intensity exercise. *Am. J. Physiol.*, 266 (Endocrinol. Metab. 29): E136-E143, 1994.
- Mills, M. L., J. Chen, R. A. Neese, M. K. Hellerstein, and J.-M. Schwarz.** Mass isotopomer distribution analysis for measurement of gluconeogenesis under conditions of hyperglycemia in streptozotocin diabetic rats. (Abstract). *Diabetes*, 47: A287, 1998.
- Müller, C., F. Assimacopoulos-Jeannet, F. Mosimann, Ph. Schneiter, J. P. Rioux, C. Pachiaudi, J. P. Felber, E. Jéquier, B. Jeanrenaud, and L. Tappy.** Endogenous glucose production, gluconeogenesis and liver concentration in obese non-diabetic patients. *Diabetologia*, 40: 463-468, 1997.
- Neese, R. A., J.-M. Schwarz, D. Faix, S. Turner, A. Letscher, D. Vu, and M. K. Hellerstein.** Gluconeogenesis and intrahepatic triose phosphate flux in response to fasting or substrate loads. Application of the mass isotopomer distribution analysis technique with testing of assumptions and potential problems. *J. Biol. Chem.*, 270: 14452-14463, 1995.
- Nilson, L. H: son, and E. Hultman.** Liver and muscle glycogen in man after glucose and fructose infusion. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 33: 5-10, 1974.
- Nilson, L. H: son.** Liver glycogen content in man in the postabsorptive state. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 32: 317-323, 1973.
- Nilson, L. H: son, P. Fürst, and E. Hultman.** Carbohydrate metabolism of the liver in normal man under varying dietary conditions. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 32: 331-337, 1973a.
- Nilson, L. H: son, and E. Hultman.** Liver glycogen in man: The effect of total starvation or a carbohydrate-poor diet followed by carbohydrate refeeding. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 32: 325-330, 1973b.
- Odermatt D., Y. Burelle, F. Péronnet, D. Massicotte, and C. Hillaire-Marcel.** Measure of liver and muscle glycogen oxidation during prolonged exercise using selective pre-labeling of glycogen stores. *Diabete & Metabolisme*, 21: 13, 1995.

- Odermatt D., Y. Burelle, F. Péronnet, D. Massicotte, and C. Hillaire-Marcel. Oxidation of liver and muscle glycogen during exercise using selective enrichment of glycogen stores. Third annual meeting of the Canadian Society for Exercise Physiology (CSEP), Québec, Octobre 1995a.
- Okajima, F., M. Chenoweth, R. Rognstad, A. Dunn, and J. Katz. Metabolism of ^3H and ^{14}C -labeled lactate in starved rats. *Biochem. J.*, 194: 525-540, 1981.
- Panteleev, N., F. Péronnet, C. Hillaire-Marcel, C. Lavoie, and D. Massicotte. Carbon isotope fractionation between blood and expired CO_2 at rest and exercise. *Respir. Physiol.*, 116: 77-83, 1999.
- Peroni, O., V. Large, F. Diraison, and M. Beylot. Glucose production and gluconogenesis in postabsorptive and starved normal and streptozotocin-diabetic rats. *Metabolism*, 46: 1358-1363, 1997.
- Peroni, O., V. Large, and M. Beylot. Measuring gluconeogenesis with [2- ^{13}C] glycerol and mass isotopomer distribution analysis of glucose. *Am. J. Physiol.*, 269 (Endocrinol. Metabol. 32): E516-E523, 1995.
- Péronnet, F., N. Rheume, C. Lavoie, C. Hillaire-Marcel, and D. Massicotte. Oral [^{13}C]glucose oxidation during prolonged exercise after high- and low-carbohydrate diets. *J. Appl. Physiol.*, 85: 723-730, 1998.
- Péronnet, F., E. Adopo, D. Massicotte, G.R. Brisson, and C. Hillaire-Marcel. Method for computing the oxidation of two ^{13}C -substrates ingested simultaneously during exercise. *J. Appl. Physiol.*, 75: 1419-22, 1993.
- Péronnet, F., E. Adopo, D. Massicotte, G. R. Brisson, and C. Hillaire-Marcel. Comparison of two methods for computing exogenous substrate oxidation using ^{13}C -labeling. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 25: 297-302, 1993a.
- Péronnet, F., E. Adopo, D. Massicotte, C. Hillaire-Marcel, G. R. Brisson, and C. Y. Guezennec. Exogenous starch oxidation using ^{14}C labeling. *J. Appl. Physiol.*, 73 :2719-22, 1992.
- Péronnet, F., E. Adopo, D. Massicotte, and C. Hillaire-Marcel. Exogenous substrate oxidation during exercise: studies using isotopic labelling. *Int. J. Sports Med.*, 13: S123-125, 1992a.

- Péronnet, F., E. Adopo, D. Massicotte, C. Hillaire-Marcel, and G. R. Brisson.** Oxidation rate of four types of carbohydrates ingested 30 min before a period of prolonged exercise at moderate intensity in healthy male subjects. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 24: 1066-68, 1992b.
- Péronnet, F., E. Adopo, D. Massicotte.** *Exogenous substrate utilization during prolonged exercise: studies with ¹³C-labeling.* In: *Muscle Fatigue Mechanisms in Exercise and Training*, edited by P. Marconnet, P. V. Komi, B. Saltin, and O. M. Sejersted. Basel: Karger, 1992, vol. 34, p. 195-206. (Medicine and Sport Science Ser.)
- Péronnet, F., D. Massicotte, G. R. Brisson, and C. Hillaire-Marcel.** Use of ¹³C substrates for metabolic studies in exercise: methodological considerations. *J. Appl. Physiol.*, 69: 1047-52, 1990.
- Petersen, K. F., M. Krssak, V. Navarro, V. Chandramouli, R. Hundal, W. C. Schumann, B. R. Landau, and G. I. Shulman.** Contributions of net hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis to glucose production in cirrhosis. *Am. J. Physiol.*, 276: E529-E535, 1999.
- Petersen, K. F., D. Laurent, D. L. Rothman, G. W. Cline, and G. I. Shulman.** Mechanism by which glucose and insulin inhibit net hepatic glycogenolysis in humans. *J. Clin. Invest.*, 101: 1203-1209, 1998.
- Petersen, K. F., T. Price, G. W. Cline, D. L. Rothman, and G. I. Shulman.** Contribution of net hepatic glycogenolysis to glucose production during the early postprandial period. *Am. J. Physiol.*, 270: E186-E191, 1996.
- Phillips, S. M., H. J. Green, M. A. Tarnopolsky, G. J. F. Heigenhauser, R. E. Hill, and S. M. Grant.** Effects of training duration on substrate turnover and oxidation during exercise. *J. Appl. Physiol.*, 81: 2182-2191, 1996.
- Phillips, S. M., H. J. Green, M. A. Tarnopolsky, and S. M. Grant.** Decreased glucose turnover after short-term training is unaccompanied by changes in muscle oxidative potential. *Am. J. Physiol.*, 269 (Endocrinol. Metab. 32): E222-E230, 1995.
- Pilegaard, H., J. Bangsbo, E. A. Richter, and C. Juel.** Lactate transport studied in sarcolemmal giant vesicles from human muscle biopsies: relation to training status. *J. Appl. Physiol.*, 77: 1858-1862, 1994.

- Podolin, D. A., Y. Wei, and M. J. Pagliassotti.** Effects of high-fat diet and voluntary wheel running on gluconeogenesis and lipolysis in rats. *J. Appl. Physiol.*, 86: 1374-1380, 1999.
- Podolin, D. A., T. T. Gleeson, and R. S. Mazzeo.** Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis: Influence of age and training. *Am. J. Physiol.*, 270 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 39): R365-R372, 1996.
- Podolin, D. A., T. T. Gleeson, and R. S. Mazzeo.** Role of norepinephrine in hepatic gluconeogenesis: Evidence of aging and training effects. *Am. J. Physiol.*, 267 (Endocrinol. Metab. 30): E680-E686, 1994.
- Popper, H., and O. Wozasek.** Zur kenntnis des glykogengehaltes des leichenleber. *Virchows Arch. Path. Anat.*, 279: 819, 1931.
- Postle, A. D., and D. P. Bloxham.** The use of tritiated water to measure absolute rates of glycogen synthesis. *Biochem. J.*, 192: 65-73, 1980.
- Previs, S. F., G. W. Cline, and G. L. Shulman.** A critical evaluation of mass isotopomer distribution analysis of gluconeogenesis in vivo. *Am. J. Physiol.*, 277 (Endocrinol. Metabol. 1): E154-E160, 1999.
- Previs, S. F., P. T. Hallowell, K. D. Neimanis, F. David, and H. Brunengraber.** Limitations of the mass isotopomer distribution analysis of glucose to study gluconeogenesis. Heterogeneity of glucose labeling in incubated hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 273: 16853-16859, 1998.
- Previs, S. F., K. S. Martin, J. W. Hazey, M. V. Soloviev, A. P. Keating, D. Lucas, F. David, J. Koshy, D. W. Kirschenbaum, K.-Y. Tserng, and H. Brunengraber.** Contributions of liver and kidneys to glycerol production and utilization in the dog. *Am. J. Physiol.*, 271 (Endocrinol. Metabol. 34): E1118-E1124, 1996.
- Previs, S. F., C. A. Fernandez, D. Yang, M. V. Soloviev, F. David, and H. Brunengraber.** Limitations of the mass isotopomer distribution analysis glucose to study gluconeogenesis. Substrate cycling between glycerol and triose phosphates in liver. *J. Biol. Chem.*, 270: 19806-19815, 1995.
- Radziuk, J.** Hepatic glycogen in humans. I. Direct formation after oral and intravenous glucose or after a 24-h fast. *Am. J. Physiol.*, 257: E145-157, 1989.

- Radziuk, J.** Hepatic glycogen in humans. II. Gluconeogenetic formation after oral and intravenous glucose. *Am. J. Physiol.*, 257: E158-169, 1989a.
- Radziuk, J.** Developments in the tracer measurement of gluconeogenesis and glycogenesis in vivo: an overview. *Federation Proc.*, 41: 88-90, 1982.
- Radziuk, J.** Sources of carbon in hepatic glycogen synthesis during absorption of an oral glucose load in humans. *Federation Proc.*, 41: 110-116, 1982a.
- Rigoulet, M., X. M. Leverve, P. J. A. Plomp, and A. J. Meijer.** Stimulation by glucose of gluconeogenesis in hepatocytes isolated from starved rats. *Biochem. J.*, 245: 661-668, 1987.
- Roden, M., G. Perseghin, K. F. Petersen, J. H. Hwang, G. W. Cline, K. Gerow, D. L. Rothman, and G. I. Shulman.** The roles of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glycogen synthesis and turnover in humans. *J. Clin. Invest.*, 97: 642-648, 1996.
- Rognstad, R.** Estimation of gluconeogenesis and glycogenolysis in Vivo using tritiated water. *Biochem. J.*, 279: 911, 1991.
- Rognstad, R.** Gluconeogenesis in Vivo : Correction factors for interaction with the Krebs Cycle. *Med. Sci. Res.*, 16: 293-194, 1988.
- Rognstad, R., and J. Katz.** Role of pyruvate kinase in the regulation of gluconeogenesis from L-lactate. *J. Biol. Chem.*, 252: 1831-1833, 1977.
- Rognstad, R., and P. Wals.** The metabolism of L-[3-3h] lactate by isolated hamster liver cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 437: 16-21, 1976.
- Rognstad, R., D. G. Clark, and J. Katz.** Glucose synthesis in tritiated water. *Eur. J. Biochem.*, 47: 383-388, 1974.
- Rognstad, R., and J. Katz.** Gluconeogenesis in the kidney cortex. Quantitative estimation of carbon flow. *J. Biol. Chem.*, 247: 6047-6054, 1972.
- Romijn, J. A., E. F. Coyle, J. Hibbert, and R. R. Wolfe.** Comparison of indirect calorimetry and a new breath $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio method during strenuous exercise. *Am. J. Physiol.*, 263 (Endocrinol. Metabol. 26): E64-E71, 1992.
- Rooney, D. P., R. D. G. Neely, C. Cullen, C. N. Ennis, B. Sheridan, A. B. Atkinson, E. R. Trimble, and P. M. Bell.** The effect of cortisol on glucose/glucose-6-phosphate cycle activity and insulin action. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77: 1180-1183, 1993.

- Roth, D. A.** The sarcolemmal lactate transporter: transmembrane determinants of lactate flux. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 23: 925-934, 1991.
- Rothman, D. L., I. Magnusson, L. D. Katz, G. W. Cline, R. G. Shulman, and G. I. Shulman.** Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with ^{13}C NMR. *Science*, 254: 573-576, 1991.
- Ryan, C. K., and J. Radziuk.** Muscle gluconeogenesis during recovery from a prolonged swim in rats. *Am. J. Physiol.*, 267 (Endocrinol. Metab. 30): E210-E218, 1994.
- Ryan, C., K. Ferguson, and J. Radziuk.** Glucose dynamics and gluconeogenesis during and after prolonged swimming in rats. *J. Appl. Physiol.*, 74: 2404-2411, 1993.
- Schumann, W. C., I. Magnusson, V. Chandramouli, K. Kumaran, J. Wahren, and B. R. Landau.** Metabolism of [2- ^{14}C] acetate and its use in assessing hepatic Krebs Cycle activity and gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.*, 266: 6985-6990, 1991.
- Sestoft, L., J. Trap-Jensen, J. Lyngsø, J. P. Clausn, J. J. Holst, S. L. Nielsen, J. F. Rehfeld, and O. Schaffalitzky de Muckadell.** Regulation of gluconeogenesis and ketogenesis during rest and exercise in diabetic subjects and normal men. *Clin. Sci. and Mol. Med.*, 53: 419-422, 1977.
- Shalwitz, R. A., T. J. Beth, A.-M. K. MacLeod, S. J. Tucker, and G. G. Rolison.** Use of $^2\text{H}_2\text{O}$ to study labeling in plasma glucose and hepatic glycogen during a hyperglycemic clamp. *Am. J. Physiol.*, 266: E433-E437, 1994.
- Shalwitz, R. A., N. V. Reo, N. N. Becker, and J. J. Ackerman.** Visibility of mammalian hepatic glycogen to the NMR experiment, in vivo. *Magn. Reson. Med.*, 5: 462-465, 1987.
- Sherman, W. M., and D. R. Lamb.** *Nutrition during prolonged exercise.* In: *Perspectives in Exercise Science and Sports Medicine. Prolonged Exercise*, edited by D. R. Lamb and R. Murray. Indianapolis, IN: Benchmark, 1988, vol. 1, p. 213-280.
- Shulman, G. I., R. A., DeFronzo, and L. Rossetti.** Differential effect of hyperglycemia and hyperinsulinemia on the pathways of hepatic glycogen repletion as assessed by ^{13}C NMR. *Am. J. Physiol.*, 260: E731-E735, 1991.
- Shulman, G. I., G. Cline, W. C. Schumann, V. Chandramouli, K. Kumaran, and B. R. Landau.** Quantitative comparison of pathways of hepatic glycogen repletion in fed and fasted humans. *Am. J. Physiol.*, 259: E335-E341, 1990.

- Siler, S. Q., R. A. Neese, M. P. Christiansen, and M. K. Hellerstein.** The inhibition of gluconeogenesis following alcohol in humans. *Am. J. Physiol.*, 275 (Endocrinol. Metabol. 38): E897-E907, 1998.
- Sillerud, L.O., and R. G. Shulman.** Structure and metabolism of mammalian liver glycogen monitored by carbon-13 nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, 22: 1087-1094, 1983.
- Sonne, B., K. J. Mikines, and H. Galbo.** Glucose turnover in 48-hour-fasted running rats. *Am. J. Physiol.*, 252 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 21): R587-R593, 1987.
- Sonne, B., and H. Galbo.** Carbohydrate metabolism in fructose-fed and food-restricted running rats. *J. Appl. Physiol.*, 61: 1457-1466, 1986.
- Sonne, B., and H. Galbo.** Carbohydrate metabolism during and after exercise in rats: studies with radioglucose. *J. Appl. Physiol.*, 59: 1627-1639, 1985.
- Sonne, B., K. J. Mikines, E. A. Richter, N. J. Christensen, and H. Galbo.** Role of liver nerves and adrenal medulla in glucose turnover of running rats. *J. Appl. Physiol.*, 59: 1640-1646, 1985a.
- Stanley, W. C., J. A., Wisneski, E. W. Gertz, R. A. Neese, and G. A. Brooks.** Glucose and lactate interrelations during moderate-intensity exercise in humans. *Metabolism*, 37: 850-858, 1988.
- Stein, T. P., R. W. Hoyt, M. O'Toole, M. J. Leskiw, M. D. Schluter, R. R. Wolfe, and W. D. B. Hiller.** Protein and energy metabolism during prolonged exercise in trained athletes. *Int. J. Sports Med.*, 10: 311-316, 1989.
- Strisower, E. H., G. D. Kohler, and L. L. Chaikoff.** Incorporation of acetate carbon into glucose by liver slices from normal and alloxan-diabetic rats. *J. Biol. Chem.*, 198: 115-126, 1952.
- Stumvoll, M., C. Meyer, G. Perriello, M. Kreider, S. Welle, and J. Gerich.** Human kidney and liver gluconeogenesis: Evidence for organ substrate selectivity. *Am. J. Physiol.*, 274 (Endocrinol. Metab. 37): E817-E826, 1998.
- Stumvoll, M., G. Perriello, N. Nurjhan, A. Bucci, S. Welle, P.-A. Jansson, G. Dailey, D. Bier, T. Jenssen, and J. Gerich.** Glutamine and alanine metabolism in NIDDM. *Diabetes*, 45: 863-868, 1996.

- Sumida, K. D., and C. M. Donovan.** Enhanced hepatic gluconeogenic capacity for selected precursors after endurance training. *J. Appl. Physiol.*, 79: 1883-1888, 1995.
- Sumida K. D. , F. Frisch, and C. M. Donovan.** Training suppresses hepatic lactate dehydrogenase activity without altering the isoenzyme profile. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 27: 507-511, 1995.
- Sumida, K. D., and C. M. Donovan.** Endurance training fails to inhibit skeletal muscle glucose uptake during exercise. *J. Appl. Physiol.*, 76: 1876-81, 1994.
- Sumida, K. D., J. H. Urdiales, and C. M. Donovan.** Enhanced gluconeogenesis from lactate in perfused livers after endurance training. *J. Appl. Physiol.*, 74: 782-787, 1993.
- Sunehag, A. L., R. J. Schlanler, P. J. Reeds, M. W. Haymond, and D. M. Bier.** Gluconeogenesis in very preterm infants receiving parenteral nutrition. *Ped. Res.*, 42: 410, 1997.
- Swensen, T., G. Crater, D. R. Bassett, Jr., and E. T. Howley.** Adding polylactate to a glucose polymer drink does not improve endurance. *Int. J. Sports Med.*, 15: 430-434, 1994.
- Swensson, A.** Contributions to the knowledge of the effect of exogenous insulin on the glycogen storage of normal animals and a survey of factors normally influencing that storage. *Acta Physiol. Scand.*, 11 (Suppl. 33), 1945.
- Tayek, J. A., and J. Katz.** Glucose production, recycling, Cori cycle, and gluconeogenesis in humans : relationship to serum cortisol. *Am. J. Physiol.*, 272 (Endocrinol. Metab. 35): E476-E484, 1997.
- Tayek, J. A., and J. Katz.** Glucose production, recycling, and gluconeogenesis in normals and diabetics : a mass isotopomer [U-¹³C] glucose study. *Am. J. Physiol.*, 270 (Endocrinol. Metab. 33): E709-E717, 1996.
- Taylor, C. B., B. Mikkelsen, J. A. Anderson, and D. T. Forman.** Human serum cholesterol synthesis measured with the deuterium label. *Arch. Pathol.*, 81: 213-232, 1966.
- Taylor, R., T. B. Price, D. L. Rothman, R. G. Shulman, and G. I. Shulman.** Validation of ¹³C NMR measurement of human skeletal muscle glycogen by direct biochemical assay of needle biopsy samples. *Magn. Reson. Med.*, 27: 13-20, 1992.

- Tipton, K. D., A. A. Ferrando, S. M. Phillips, D. Doyle Jr., and R. R. Wolfe.** Postexercise net protein synthesis in human muscle from orally administered amino acids. *Am. J. Physiol.*, 276: E628-634, 1999.
- Toftgaard Nielsen, T., and P. E. Bloch Thomsen.** Leg and splanchnic arteriovenous differences of plasma citrate in exercising man. *J. Appl. Physiol.*, 46: 120-127, 1979.
- Tokuyama, K., Y. Higaki, J. Fujitami, A. Kiyonaga, H. Tanaka, M. Shindo, M. Fukushima, Y. Nakai, H. Imura, I. Nagata, and A. Taniguchi.** Intravenous glucose tolerance test-derived glucose effectiveness in physically trained humans. *Am. J. Physiol.*, 265 (Endocrinol. Metab. 28): E298-E303, 1993.
- Trimmer, J. K., B. C. Bergman, A. L. Friedlander, G. A. Cassazza, M. A. Horning, J.-M. Schwarz, and G. A. Brooks.** Mass isotopomer distribution analysis of gluconeogenesis during hard exercise using [2-¹³C] glycerol and [3-¹³C] alanine. (Abstract). *FASEB J.* 12: A737, 1998.
- Turcotte, L. P., and G. A. Brooks.** Effects of training on glucose metabolism of gluconeogenesis-inhibited short-term-fasted rats. *J. Appl. Physiol.*, 68: 944-954, 1990.
- Turcotte, L. P., A. S. Rovner, R. R. Roark, and G. A. Brooks.** Glucose kinetics in gluconeogenesis-inhibited rats during rest and exercise. *Am. J. Physiol.*, 258 (Endocrinol. Metab. 21): E203-E211, 1990.
- Turner, S. M., P. A. Linfoot, R. A. Neese, and M. K. Hellerstein.** Effects of leptin on hepatic carbohydrate metabolism in normal and ob/ob mice. (Abstract). *Diabetes*, 47: A279, 1998.
- Van der Meer, R., and J. M. Tager.** A simple method for the perfusion of isolated liver cells. *FEBS Lett.*, 67: 36-40, 1976.
- Vissing, J., J. L. Wallace, and H. Galbo.** Effect of liver glycogen content on glucose production in running rats. *J. Appl. Physiol.*, 66: 318-322, 1989.
- Vissing, J., B. Sonne, and H. Galbo.** Regulation of hepatic glucose production in running rats studied by glucose infusion. *J. Appl. Physiol.*, 65: 2552-2557, 1988.
- Vissing, J., B. Sonne, and H. Galbo.** Role of metabolic feedback regulation in glucose production of running rats. *Am. J. Physiol.*, 255 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 24): R400-R406, 1988a.

- Wahren, J., L. Hagenfeldt, and P. Felig.** Splanchnic and leg exchange of glucose, amino acids, and free fatty acids during exercise in diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, 55: 1303-1314, 1975.
- Wahren, J., P. Felig, G. Ahlborg, and L. Jorfeldt.** Glucose metabolism during leg exercise in man. *J. Clin. Invest.*, 50: 2715-2725, 1971.
- Wasserman, D. H., J. L. Johnson, J. L. Bupp, D. B. Lacy, and D. P. Bracy.** Regulation of gluconeogenesis during rest and exercise in the depancreatized dog. *Am. J. Physiol.*, 265 (Endocrinol. Metab. 28): E51-E60, 1993.
- Wasserman, D. H., P. E. Williams, D. B. Lacy, D. Bracy, and A. D. Cherrington.** Hepatic nerves are not essential to the increase in hepatic glucose production during muscular work. *Am. J. Physiol.*, 259 (Endocrinol. Metab. 22): E195-E203, 1990.
- Wasserman, D. H., P. E. Williams, D. B. Lacy, D. R. Green, and A. D. Cherrington.** Importance of intrahepatic mechanisms to gluconeogenesis from alanine during exercise and recovery. *Am. J. Physiol.*, 254 (Endocrinol. Metab. 17): E518-E525, 1988.
- Weinman, E. O., E. H. Strisower, and I. L. Chaikoff.** Conversion of fatty acids to carbohydrate. Application of isotopes to this problem and role of Krebs Cycle as a synthetic pathway. *Physiol. Rev.*, 37: 252-272, 1957.
- Winder, W.W.** Regulation of hepatic glucose production during exercise. *Exerc. Sport Sci. Rev.*, 13 : 1-31, 1985.
- Winder, W. W., M. A. Beattie, and R. T. Holman.** Endurance training attenuates stress hormone responses to exercise in fasted rats. *Am. J. Physiol.*, 243 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 12): R179-R184, 1982.
- Winder, W. W., R. T. Holman, and S. J. Garhart.** Effect of endurance training on liver cAMP response to prolonged submaximal exercise. *Am. J. Physiol.*, 240 (5): R330-334, 1981.
- Winder, W. W. , R. C. Hickson, J. M. Hagberg, A. A. Ehsani, and J. A. McLane.** Training-induced changes in hormonal and metabolic responses to submaximal exercise. *J. Appl. Physiol.*, 46: 766-771, 1979.
- Winder, W. W., J. M. Hagberg, R. C. Hickson, A. A. Ehsani, J. A. McLane.** Time course of sympathoadrenal adaptation to endurance exercise training in man. *J. Appl. Physiol.*, 45: 370-374, 1978.

Wolf, G. The effect of fasting and fructose and glucose infusion on gluconeogenesis and triose phosphate flux in rats in vivo. *Nutr. Rev.*, 53: 299-301, 1995.

Zurlo, F., K. Larson, C. Bogardus, and E Ravussin. Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. *J. Clin. Invest.*, 86: 1423-1427, 1990.

CHAPITRE 2: ÉTUDES EXPÉRIMENTALES

- .1 **Respective oxidation of lactate and glucose ingested simultaneously during exercise using ^{13}C -labeling.**

Respective oxidation of ^{13}C -labeled lactate and glucose ingested simultaneously during exercise

160

F. PÉRONNET, Y. BURELLE, D. MASSICOTTE, C. LAVOIE, AND C. HILLAIRE-MARCEL
*Département d'Éducation Physique, Université de Montréal,
Montréal, Province of Quebec, Canada H3C 3J7*

Péronnet, F., Y. Burelle, D. Massicotte, C. Lavoie, and C. Hillaire-Marcel. Respective oxidation of ^{13}C -labeled lactate and glucose ingested simultaneously during exercise. *J. Appl. Physiol.* 82(2): 440–446, 1997.—The purpose of this experiment was to measure, by using ^{13}C labeling, the oxidation rate of exogenous lactate (25 g, as Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+} salts) and glucose (75 g) ingested simultaneously (in 1,000 ml of water) during prolonged exercise (120 min, $65 \pm 3\%$ maximum oxygen uptake in 6 male subjects). The percentage of exogenous glucose and lactate oxidized were similar (48 ± 3 vs. $45 \pm 5\%$, respectively). However, because of the small amount of oral lactate that could be tolerated without gastrointestinal discomfort, the amount of exogenous lactate oxidized was much smaller than that of exogenous glucose (11.1 ± 0.5 vs. 36.3 ± 1.3 g, respectively) and contributed to only $2.6 \pm 0.4\%$ of the energy yield (vs. $8.4 \pm 1.9\%$ for exogenous glucose). The cumulative amount of exogenous glucose and lactate oxidized was similar to that observed when 100 g of [^{13}C]glucose were ingested (47.3 ± 1.8 vs. 50.9 ± 1.2 g, respectively). When [^{13}C]glucose was ingested, changes in the plasma glucose $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio indicated that between 39 and 61% of plasma glucose derived from exogenous glucose. On the other hand, the plasma glucose $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio remained unchanged when [^{13}C]lactate was ingested, suggesting no prior conversion into glucose before oxidation.

exogenous lactate; prolonged exercise; substrate oxidation; stable isotopes; insulin

INGESTION OF CARBOHYDRATES during prolonged exercise has been shown to improve performance in endurance events (8, 16, 30), and this could be due to the maintenance of a higher rate of carbohydrate oxidation (10, 13). Indeed, by using labeling with ^{13}C and ^{14}C , several studies have shown that exogenous carbohydrates ingested during exercise are oxidized at a high rate (16, 24, 26). These observations have led to the development of many sports drinks containing mixtures of hexoses, disaccharides, and glucose polymers of various lengths (22). Recently, some manufacturers have also added lactate to sports drinks (2, 7, 15, 33). Lactate supplementation during exercise is based on the observation that during prolonged moderate exercise carbon skeletons originating from muscle glycogen are shuttled among the working muscles under the form of lactate (5). Most of this lactate released from one muscle appears to be oxidized within another muscle, with only a small portion being recycled into glucose by the liver (21, 32), and the plasma lactate flux appears to be larger than the plasma glucose flux (6). Compared with exogenous glucose provided by carbohydrates in sports drinks, exogenous lactate could have the advantages of introducing fewer disturbances in the endocrine response to

exercise, to be independent of insulin for entering the working muscle fiber through a transporter distinct from that of glucose (28, 29), and to be readily available for entering the tricarboxylic acid cycle and providing reducing equivalents. In addition, complete oxidation of the lactate ion consumes one proton. Accordingly, exogenous lactate oxidation during exercise could increase muscle buffering capacity. On the other hand, because of poor gastrointestinal tolerance (33), lactate can be provided only in limited amounts during prolonged exercise and should be associated with other carbohydrates, such as glucose polymers, in sports drinks.

Only a limited number of studies have described the effect of ingesting lactate supplements on the metabolic response and performance during prolonged exercise (15, 33), and no data are available on the actual metabolic fate of ingested lactate at rest or during exercise. The purpose of the present experiment was to measure the oxidation rate of exogenous lactate (25 g) ingested along with glucose (75 g) during prolonged exercise. The oxidation rate of each of the two substrates in the mixture was measured separately by using selective ^{13}C labeling of lactate or glucose (1), and the rate was compared with the oxidation rate of an isocaloric amount of glucose. In addition, change in plasma glucose $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio when [^{13}C]lactate was ingested was used to estimate the extent of possible conversion of lactate into glucose by the liver.

METHODS

Subjects. The experiment was conducted on six active and healthy male subjects who gave their informed written consent to participate in the study, which was approved by the Institutional Board on the Use of Human Subjects in Research. Their age, weight, height, and maximal oxygen uptake ($\dot{V}\text{O}_{2\text{max}}$) on a cycle ergometer were 21 ± 1 yr, 65 ± 2 kg, 172 ± 2 cm, and 4.40 ± 0.06 l/min, respectively (mean \pm SE). All subjects had a normal fasting plasma glucose concentration (4.71 ± 0.29 mM).

Experimental protocol. $\dot{V}\text{O}_{2\text{max}}$ and experimental workloads on the cycle ergometer (Ergomeca, La Bayette, France) were determined for each subject during a preliminary test session using open-circuit spirometry (1100 medical gas analyzer, Marquette Electronics, Milwaukee, WI). Subsequently, at 1-wk intervals, all subjects performed four exercises of 120-min duration at a workload corresponding to $65 \pm 3\%$ $\dot{V}\text{O}_{2\text{max}}$ (218.3 ± 10.6 W). The exercises were performed at 1:00 P.M. in a laboratory with controlled temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity ($45 \pm 5\%$). The last evening meal [at 7:00 P.M., 1,300 kcal (55% carbohydrates, 30% fat, and 15% proteins)], the morning breakfast [at 7:30 A.M., 800 kcal (60% carbohydrates, 30% fat, and 10% proteins)], and a small snack [at 11:00 A.M., 500 kcal (50% carbohydrates, 35% fat, and 15% proteins)] were provided to the subjects. In addition, to keep a low

background of ¹³C enrichment of plasma glucose and expired CO₂ during the period of experiments, ingestion of carbohydrates from plants with the C₄ photosynthetic cycle, which are naturally enriched in ¹³C (20), was avoided. Subjects also refrained from exercising and from drinking coffee and alcohol for 2 days before each experiment.

During the exercise period, the subjects ingested 1,000 ml of water at room temperature, containing 100 g of glucose (*trial 1*) or a mixture of 75 g of glucose and 25 g of lactate (*trials 2 and 3*). The solutions were given in five equal volumes (20 g of substrates in 200 ml) taken immediately after the beginning of exercise and at 20, 40, 60, and 80 min during the exercise period. In *trials 1 and 2*, the glucose ingested was artificially labeled with ¹³C, whereas in *trial 3* the lactate was artificially labeled with ¹³C to separately measure the oxidation rate of exogenous glucose when ingested alone or in combination with lactate and the oxidation rate of lactate when ingested in combination with glucose. Glucose, naturally poor in ¹³C [Dextroport, Vitagermine, Villenave-d'Ornon, France; -25.2‰ [δ-¹³C] Pee Dee Belemnite], was enriched with [U-¹³C]glucose (¹³C/C >99%, Isotec, Miamisburg, OH) to achieve a final isotopic composition close to +25‰ [δ-¹³C]PDB₁ (actual value measured by mass spectrometry: +24.5 and +24.3‰ [δ-¹³C]PDB₁, in *trials 1 and 2*, respectively). Lactate was administered as a mixture of four salts (12 g sodium lactate, 4.5 g potassium lactate, 13 g calcium lactate, and 3.4 g magnesium lactate, kindly provided by PURAC America, Lincolnshire, IL; -27.4‰ [δ-¹³C]PDB₁), to reduce the amount of each cation ingested. In addition, the presence of calcium and magnesium with two negative charges allowed us to somewhat reduce the osmotic pressure of the solution, which, however, remained very high (933 mM taking into account the glucose present in the solution, compared with 556 mM when 100 g of glucose were ingested). The total dose of lactate salts that could be tolerated was determined from preliminary experiments. As reported in previous studies of lactate ingestion during exercise (15, 33), gastrointestinal discomfort was experienced by about one-half of the subjects, who developed mild diarrhea in the evening after the test. The lactate was traced with [U-¹³C]-labeled sodium lactate (¹³C/C >99%, Isotec), the final ¹³C/¹²C ratio in the mixture of lactate salts being +62.5‰ [δ-¹³C]PDB₁. Finally, to correct for the shift in ¹³C background enrichment of expired CO₂ observed in response to exercise (25), the subjects were submitted to an additional exercise session without ingestion of any exogenous substrate.

Measurements and computations. Observations were made at rest, immediately before exercise, and every 15 min during the exercise period. Carbohydrate and fat oxidation were computed from carbon dioxide production (VCO₂) and oxygen consumption (V̇O₂) by using open-circuit spirometry (20- and 5-min collection periods at rest and exercise, respectively). For the measurement of ¹³C/¹²C ratios in expired CO₂, 80-ml samples of expired gases were collected and stored in vacutainers (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Finally, 8-ml blood samples were withdrawn through a catheter (Baxter Health Care, Valencia, CA) inserted into an antecubital vein 30 min before the beginning of experiment for the measurement of plasma glucose lactate (Sigma Diagnostics, Sigma, Mississauga, Canada), and insulin (KTSP-11001, Immunocorp Sciences, Montreal, Canada) concentrations, and for the measurement of ¹³C/¹²C ratios in plasma glucose (at 40 and 80 min only). Plasma samples were stored at -80°C until analysis.

For the measurement of glucose enrichment, glucose was extracted from plasma according to the method described and validated by Wolfe et al. (35). The plasma (1 ml) was first deproteinized with barium hydroxide (1.5 ml, 0.3 N) and zinc

sulfate (1.5 ml, 0.3 N). The soluble phase was separated from the protein precipitate by centrifugation (20 min, 3,000 g, 4°C), and the remaining protein precipitate was washed with 3 ml of distilled water. The glucose was then separated by double-bed ion exchange chromatography by running the combined supernatants (7 ml) through superposed columns (0.5 × 2 cm) of AG 50W-X8 H⁻ (200-400 mesh) and (0.5 × 2 cm) of AG 1-X8 chloride (200-400 mesh) resins (Bio-Rad, Mississauga, Canada) equilibrated and eluted with distilled water. The solution obtained (~10 ml) was evaporated to dryness (Virtis Research Equipment, New York, NY). The average recovery of glucose was 86 ± 3%. The glucose was then combusted for 60 min at 400°C in presence of copper oxide (20 mg), and the CO₂ recovered was analyzed by mass spectrometry. This procedure for purification of plasma glucose has been demonstrated to yield values for [¹³C]glucose enrichment similar to those obtained using the more specific isolation procedure of plasma glucose by crystallization as potassium gluconate (35). In the present experiment, the material obtained after evaporation was resuspended in 0.5 ml of distilled water for screening for possible contamination by nonglucose carbons. Compared with the amount of glucose present (8.2 mM), the amounts of glycerol (0.07-0.09 mM) and lactate (0-0.04 mM) present were negligible, and no proteins were detectable.

When [¹³C]glucose was ingested (*trials 1 and 2*), the percentage of plasma glucose derived from exogenous glucose was computed as follows

$$\% \text{ *Glu} = \{R_{\text{pl}} - R_{\text{ref}}/R_{\text{exo}} - R_{\text{ref}}\} \times 100 \quad (1)$$

where *Glu is [¹³C]-labeled glucose, R_{pl} and R_{ref} are plasma glucose ¹³C/¹²C ratios at rest and during exercise, respectively, and R_{exo} is the exogenous glucose ¹³C/¹²C ratio.

Oxidation of glucose and fatty acids was computed from V̇O₂ and V̇CO₂ as follows (27)

$$\text{glucose} = 4.5850 \dot{V}\text{CO}_2 - 3.2255 \dot{V}\text{O}_2 \quad (2)$$

$$\text{fatty acids} = -1.7012 \dot{V}\text{CO}_2 + 1.6946 \dot{V}\text{O}_2 \quad (3)$$

with mass in grams and gas volume in liters (STPD). The stoichiometry of lactate oxidation is similar to that of glucose. Accordingly, when lactate was ingested, the amount oxidized, if any, was included in the amount of glucose oxidized which was computed.

Measurements of ¹³C/¹²C ratios in expired CO₂ and in CO₂ from combustion of glucose extracted from the plasma were performed by mass spectrometry (Prism, Manchester, UK) after cryodistillation, as previously described (1). The isotopic composition was expressed in per mill difference by comparison with the PDB₁ Chicago Standard

$$\% \text{ [}\delta\text{-}^{13}\text{C]PDB}_1 = [(R_{\text{spl}}/R_{\text{std}}) - 1] \times 1,000$$

where R_{spl} and R_{std} are the ¹³C/¹²C ratio in the sample and standard (1.12372‰), respectively (14). The oxidation rate of exogenous substrate (m_{exo} , g/min) was computed as follows

$$m_{\text{exo}} = \dot{V}\text{CO}_2 \{(R_{\text{exp}} - R_{\text{ref}})/(R_{\text{exo}} - R_{\text{ref}})\}/k \quad (4)$$

where V̇CO₂ is in liters/min STPD, R_{exp} is the ¹³C/¹²C ratio observed in expired CO₂, R_{ref} is the ¹³C/¹²C ratio in expired CO₂ in the control trial, R_{exo} is the ¹³C/¹²C ratio in the artificially labeled exogenous glucose or lactate ingested, and k (0.7426 l/g) is the volume of CO₂ provided by the complete oxidation of glucose or lactate (27). The computation of the amounts of exogenous substrate oxidized is made assuming

that, in response to exercise, ¹³CO₂ recovery in expired gases is complete or almost complete (11, 17, 19). In addition, the total volume of CO₂ produced during exercise is large compared with the labile bicarbonate pool. Accordingly, the influence of this pool on the amount of exogenous glucose oxidized that is computed from ¹³CO₂ recovered at the mouth can be neglected (23).

The amount of unlabeled glucose (endogenous + exogenous unlabeled glucose in *trial 2*) oxidized was computed by difference between total glucose oxidation computed from $\dot{V}O_2$ and $\dot{V}CO_2$ and the amount of labeled glucose or lactate oxidized computed from $V^{13}CO_2$ at the mouth (Eq. 4). The contribution of the oxidation of the various substrates to the energy yield was computed from their respective energy potentials at 37°C [3.87, 9.75, and 3.76 kcal/g for glucose, fatty acid, and lactate, respectively (27, 34)].

Statistics. Data are presented as means \pm SE. The main effects of time and exogenous substrate ingested (glucose vs. glucose+lactate) as well as time-substrate interactions were tested by repeated-measures analysis of variance (Statistica package). Tukey wholly significant difference tests were used to identify the location of significant differences ($P \leq 0.05$) when analysis of variance yielded a significant F ratio.

RESULTS

No significant difference was observed between the four trials for heart rate at rest before exercise (72 ± 3 beats/min, $n = 18$) and during the final 5 min of the exercise period (152 ± 3 beats/min, $n = 18$). The average $\dot{V}CO_2$ observed was also similar during the four trials (2.44 ± 0.08 ; 2.55 ± 0.09 ; 2.51 ± 0.08 and 2.47 ± 0.09 l/min, in the control trial and in *trials 1, 2, and 3*, respectively). When no exogenous substrate was ingested during exercise, the ¹³C/¹²C ratio in expired CO₂ increased and reached a plateau after ~ 30 min of exercise (Fig. 1). The observed increase in ¹³C/¹²C ratio

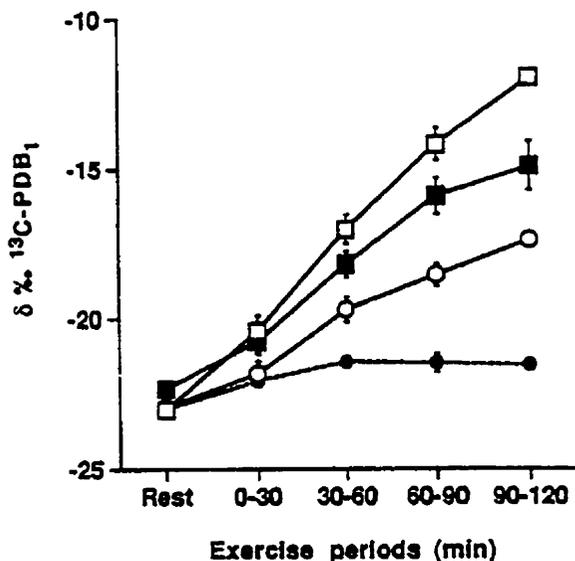


Fig. 1. Changes in ¹³C/¹²C ratio in expired CO₂ in response to exercise in control trial (●) and when [¹³C]glucose was ingested alone (□: 100 g of [¹³C]glucose) or in combination with unlabeled lactate (■, 75 g of [¹³C]glucose with 25 g of lactate), or when unlabeled glucose was ingested in combination with [¹³C]lactate (○, 75 g of glucose with 25 g of [¹³C]lactate). Data are means \pm SE of observations made over corresponding 30-min exercise period (e.g., at 30, 45, and 60 min for the 30- to 60-min period). PDB₁, Pee Dee Belemnite₁.

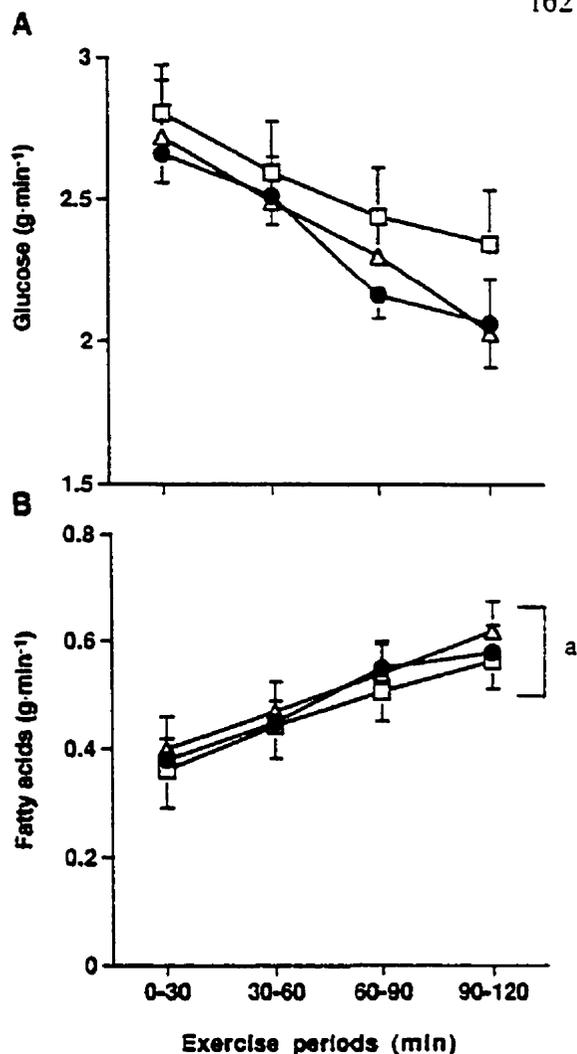


Fig. 2. Total glucose and fatty acid oxidation rates during exercise in control trial (●), when glucose was ingested alone (□, 100 g of glucose) or in combination with lactate (△, 75 g of glucose with 25 g of lactate; average values of observations in *trials 2 and 3*). Data are means \pm SE of observations made over corresponding 30-min exercise period (e.g., at 30, 45, and 60 min for the 30- to 60-min period). *Significantly different from the first 30 min of exercise; $P \leq 0.05$.

was much higher and did not plateau when ¹³C-enriched substrates were ingested during the exercise.

As shown in Fig. 2, no significant difference was observed between the oxidation rate of glucose (endogenous + exogenous, including lactate when lactate was ingested; see METHODS) and fatty acids, respectively, when glucose or the mixture of glucose and lactate was ingested. When 100 g of glucose were ingested, the oxidation rate of exogenous glucose increased steadily and significantly from an average of 0.12 ± 0.04 g/min during the first 30 min of exercise to 0.72 ± 0.03 g/min during the last 30 min of exercise (Fig. 3). When 75 g of [¹³C]glucose were ingested along with unlabeled lactate, the oxidation rate of exogenous glucose was slightly but not significantly lower than that observed when 100 g of glucose were ingested during the first 90 min. However, this difference reached statistical signifi-

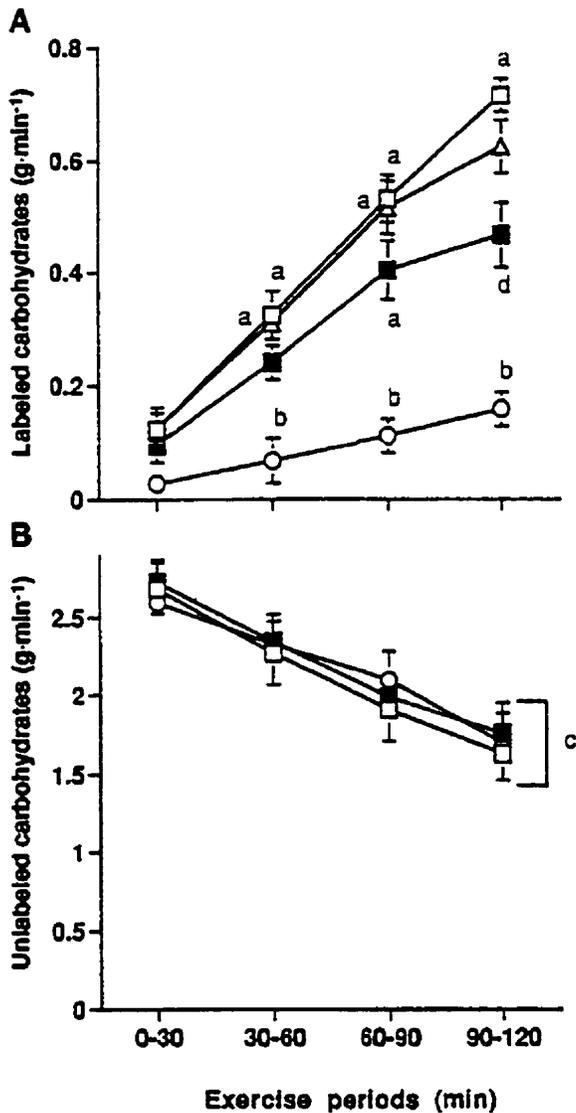


Fig. 3. Unlabeled and labeled carbohydrate (glucose or glucose + lactate) oxidation rates during exercise when [¹³C]glucose was ingested alone (□) or in combination with unlabeled lactate (■; 75 g of [¹³C]glucose with 25 g of lactate), or when unlabeled glucose was ingested in combination with [¹³C]lactate (○; 75 g of glucose with 25 g of [¹³C]lactate). Cumulative oxidation of exogenous glucose + lactate (Δ) computed from trials 2 and 3 is also shown. Values are means ± SE. *Significantly different from preceding 30-min period, $P \leq 0.05$; ^bsignificantly different from [¹³C]glucose, $P \leq 0.05$; ^csignificantly different from first 30-min period; ^dsignificantly different from 100 g of [¹³C]glucose, $P \leq 0.05$.

ance during the last 30 min of exercise (0.47 ± 0.06 vs. 0.72 ± 0.03 g/min). When 25 g of [¹³C]lactate were ingested along with 75 g of glucose, the oxidation rate of exogenous lactate which was very low at the beginning of exercise (0–30 min: 0.03 ± 0.01 g/min) steadily increased thereafter and reached 0.16 ± 0.01 g/min between 90 and 120 min. The percentage of exogenous lactate that was oxidized over the exercise period was close to that of exogenous glucose (45 ± 5 vs. 51 ± 5 and $48 \pm 3\%$ for 100 and 75 g of glucose, respectively). When 75 g of glucose were ingested in combination with lactate, the total amount of exogenous glucose oxidized during exercise was significantly lower than when 100

g of glucose were ingested alone (36.3 ± 1.3 vs. 50.9 ± 1.2 g, respectively). However, the cumulative amount of exogenous glucose and lactate oxidized was similar to the amount of glucose oxidized that was observed when 100 g of glucose were ingested (47.3 ± 1.8 vs. 50.9 ± 1.2 g, respectively; Fig. 3). Over the exercise period, the oxidation of exogenous glucose and lactate contributed $11.1 \pm 2.1\%$ to the energy yield, compared with $10.9 \pm 1.7\%$ for 100 g of exogenous glucose (not significantly different). On the other hand, the contribution of exogenous lactate oxidation to the energy yield was significantly lower ($2.6 \pm 0.4\%$).

Plasma glucose concentration remained stable throughout the exercise period, and no significant difference was observed between trial 1 (100 g of glucose) and trials 2 and 3 (75 g of glucose + 25 g of lactate; Fig. 4). Plasma lactate concentration also remained stable at ~ 1.5 mM during the exercise period when glucose alone was ingested and was slightly but not significantly higher when the mixture of glucose and lactate was ingested. The small and not significant decrease in plasma insulin concentration in response to exercise was similar with ingestion of glucose and the mixture of glucose and lactate.

Resting plasma glucose ¹³C/¹²C ratio was similar in the three trials ($-21.8 \pm 0.45\%$ [δ -¹³C]PDB₁; pooled data, $n = 18$; Fig. 5). Ingestion of [¹³C]glucose alone or in combination with unlabeled lactate during exercise resulted in significant rises in plasma glucose ¹³C/¹²C ratio. When 75 g of glucose were ingested, the percentage of plasma glucose deriving from exogenous glucose was slightly lower than when 100 g of glucose were ingested at 40 min (39 ± 3 and $47 \pm 5\%$, respectively), and this difference reached statistical significance at 80 min during the exercise (51 ± 5 and $61 \pm 6\%$, respectively). When [¹³C]lactate was ingested along with unlabeled glucose, no significant change was observed in plasma glucose ¹³C/¹²C ratio (Fig. 5).

DISCUSSION

Results from the present experiment indicate that, during prolonged exercise, about one-half of the exogenous lactate ingested in the form of a mixture of various salts was oxidized. This percentage was similar to that observed when exogenous glucose was ingested. However, the amount of lactate that could be ingested without intestinal discomfort was much smaller than that of exogenous glucose. Accordingly, lactate ingestion did not significantly modify the metabolic response to exercise, including plasma lactate concentration, and the rate of exogenous lactate oxidation and its contribution to the energy yield remained small. Finally, no significant amounts of exogenous lactate appeared to be converted into glucose before being oxidized. This observation suggests that direct oxidation was the predominant metabolic fate of the exogenous lactate that was absorbed from the gastrointestinal tract.

The rate of lactate ingestion that was tolerated with minor intestinal discomfort by the subjects in the present experiment (4.3 mg·kg⁻¹·min⁻¹) was larger

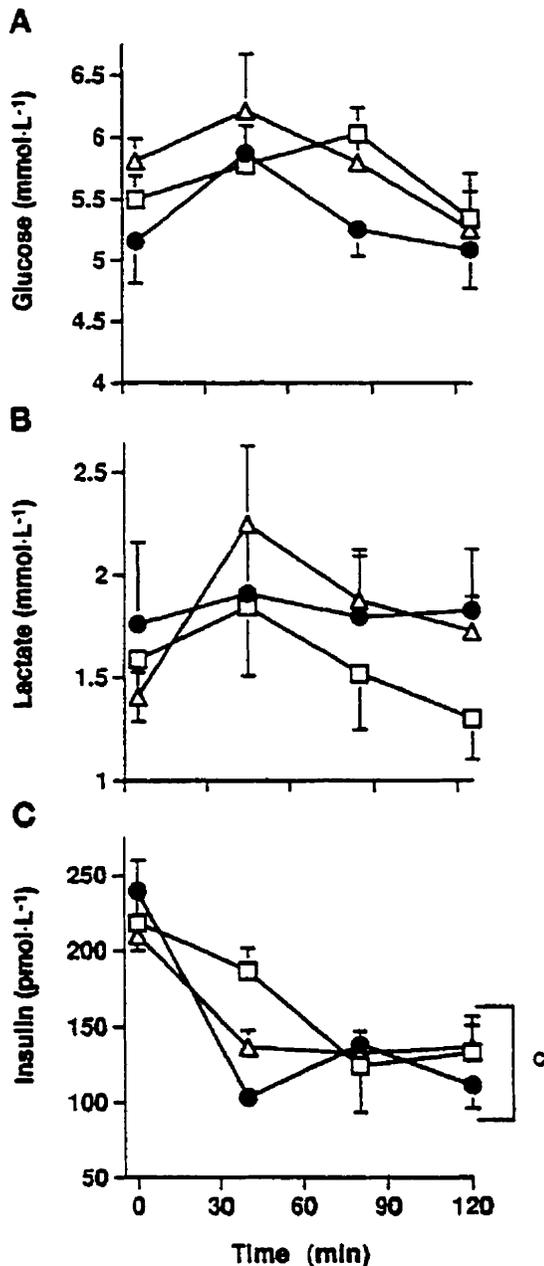


Fig. 4. Plasma glucose, lactate, and insulin concentrations at rest and at 40, 80, and 120 min of exercise in control trial (●), when glucose was ingested alone (□, 100 g of glucose) or in combination with lactate (Δ, 75 g of glucose with 25 g of lactate; values are means \pm SE of observations in trials 2 and 3). ^cSignificantly different from first 30-min period, $P \leq 0.05$.

than those used by Swensen et al. (33) and by Fahey et al. (15) (1.6 and 2.6 mg·kg⁻¹·min⁻¹, respectively) but remained well below the rate of ingestion of glucose (13–17 mg·kg⁻¹·min⁻¹). Much higher ingestion rates of glucose or glucose polymers have actually been reported without any major gastrointestinal discomfort in some previous studies (50–95 mg·kg⁻¹·min⁻¹; Refs. 3, 9, 13). The adverse effects of lactate on the gastrointestinal function is related to the much higher osmolality of lactate salt solutions compared with those of isocaloric carbohydrate solutions, particularly when in-

gested in the form of polymers, both because of the smaller molar mass of lactate and because of the presence of positively charged molecules and/or ions associated with the lactate anion.

This high osmolality of lactate solutions, which severely limits the amounts that can be administered orally, appears to be the major drawback for their use as energy supplements in sports drinks. In fact, except for the small increase in plasma pH and bicarbonate concentration reported by Fahey et al. (15), the limited amounts of lactate that can be ingested have no noticeable effect on the endocrine and metabolic response to exercise. In the studies by Fahey et al. (15) and by Swensen et al. (33), the response of plasma insulin, glucose, free fatty acid, and glycerol concentrations to exercise was similar when glucose polymers and a mixture of glucose polymers and lactate was ingested in isocaloric amounts. In addition, there was no effect of lactate ingestion on the response of plasma lactate concentration in both studies. Results from the present experiment are in line with these previous findings: compared with the observation made when 100 g of glucose were ingested, ingestion of the mixture of glucose (75 g) and lactate (25 g) did not significantly modify plasma glucose and insulin concentration or significantly increase plasma lactate concentration. The lack of effect of lactate ingestion on plasma lactate concentration during exercise could be due to the fact that the amount of lactate ingested remains small compared with the large plasma lactate turnover observed during exercise (5). It also suggests that lactate might not be absorbed from the gastrointestinal tract in significant amounts.

In the present experiment, the increase in ¹³C/¹²C ratio in expired CO₂ after [¹³C]lactate ingestion con-

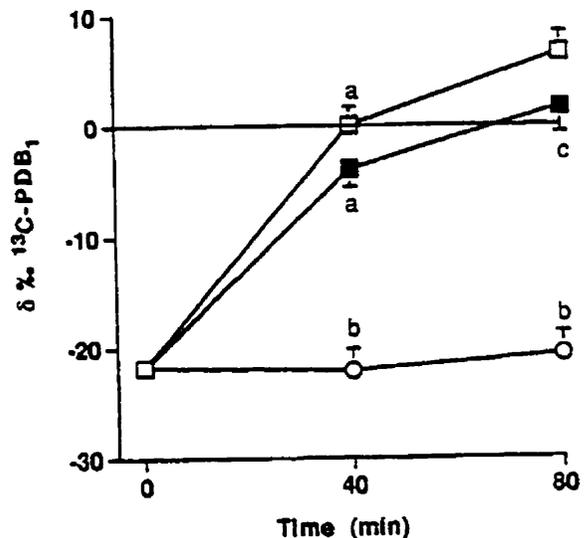


Fig. 5. Plasma glucose ¹³C/¹²C ratio at rest and at 40 and 80 min of exercise when [¹³C]glucose was ingested alone (□, 100 g) or in combination with unlabeled lactate (■, 75 g of [¹³C]glucose with 25 g of lactate), or when unlabeled glucose was ingested in combination with [¹³C]lactate (○, 75 g of glucose with 25 g of [¹³C]lactate). Values are means \pm SE. ^aSignificantly different from rest, $P \leq 0.05$; ^bsignificantly different from [¹³C]glucose; ^csignificantly different from 100 g of [¹³C]glucose, $P \leq 0.05$.

firmly that at least a portion of the lactate ingested during prolonged exercise was actually absorbed from the gastrointestinal tract and was available for oxidation. The amount of ¹³CO₂ recovered at the mouth indicates that 11.1 ± 0.5 g of the lactate ingested was oxidized or 45 ± 5% of the load. When 100 g of glucose were ingested alone or when 75 g of glucose were ingested in combination with 25 g of lactate, the percentages of the glucose loads that were actually oxidized were not significantly different (51 ± 5 and 48 ± 3%). However, the much larger amounts ingested without any gastrointestinal disturbance or discomfort translated into much larger amounts oxidized (50.9 ± 1.2 and 36.3 ± 1.3 g over the entire period of exercise). As a consequence, the contribution of exogenous glucose oxidation to the energy yield, which ranged between 8.4 ± 1.9 and 11.4 ± 2.1%, as previously reported (1) was much higher than that observed with exogenous lactate (2.6 ± 0.4%). The small contribution of exogenous lactate ingested orally during exercise to the energy yield, which is due to its poor gastrointestinal tolerance, probably explains why this energy supplement has not been shown to improve endurance performance (33).

Two major pathways exist for the oxidation of plasma lactate during prolonged exercise. The first pathway is the direct oxidation of lactate that can occur in any tissue where oxygen is consumed, including exercising muscles and the heart (4). The second pathway involves the conversion of lactate into glucose, which mainly occurs in the liver. The neoformed glucose could, in turn, be released into the blood and could be oxidized in peripheral tissues (4). Data from Mazzeo et al. (21) and Stanley et al. (31) suggest that lactate released from exercising muscles during prolonged exercise is oxidized mainly in other tissues, with only a small portion being converted into glucose in the liver (~20%). Results from the present experiment are in line with these data and suggest that oral lactate is also probably directly oxidized without being first converted into glucose. When [¹³C]glucose was ingested, the large increase in plasma glucose ¹³C/¹²C ratio observed at 40 and 80 min of exercise indicates that between 39 and 61% of plasma glucose was derived from exogenous glucose. These figures are within the range of data reported between 40 and 90 min of exercise by Costill et al. (12) after [¹⁴C]glucose ingestion and by Jandrain et al. (18) after [¹³C]fructose ingestion (~45 and 40–60%, respectively). In contrast, when [¹³C]lactate was ingested, the plasma glucose ¹³C/¹²C ratio remained unchanged from preexercise value. This observation suggests that only a small portion, if any, of the lactate ingested was converted into glucose before being oxidized, and, accordingly, that exogenous lactate did not significantly contribute to the maintenance of plasma glucose through gluconeogenesis.

The authors thank Rinske Potjewijd from PURAC America, Lincolnshire, IL, for kindly providing the lactate salts.

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and from Le Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche, Quebec, Canada.

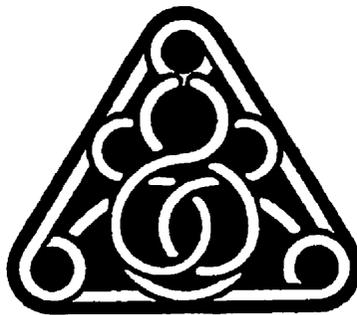
Address for reprint requests: F. Péronnet, Dept. d'Éducation Physique, Université de Montréal, CP 6128-Centre Ville, Montréal PQ, Canada H3C 3J7 (E-mail: peronnet@ere.umontreal.ca).

Received 29 May 1996; accepted in final form 21 October 1996.

REFERENCES

- Adopo, E., F. Péronnet, D. Massicotte, G. R. Brisson, and C. Hillaire-Marcel. Respective oxidation of exogenous glucose and fructose given in the same drink during exercise. *J. Appl. Physiol.* 76: 1014–1019, 1994.
- Anderson, O. Can CYTOMAX really help you "beat the burn"? *Running Res.* 9: 1–6, 1993.
- Brooke, J. D., G. J. Davies, and L. F. Green. The effects of normal and glucose syrup work diets on the performance of racing cyclists. *J. Sports Med.* 15: 257–265, 1975.
- Brooks, G. A. Current concepts in lactate exchange. *Med. Sci. Sports Exercise* 23: 895–906, 1991.
- Brooks, G. A. The lactate shuttle during exercise and recovery. *Med. Sci. Sports Exercise* 18: 360–368, 1986.
- Brooks, G. A., and C. M. Donovan. Effect of endurance training on glucose kinetics during exercise. *Am. J. Physiol.* 244 (*Endocrinol. Metab.* 7): E505–E512, 1983.
- Brouns, F., M. Fogelholm, G. Van Hall, A. Wagenmakers, and W. H. M. Saris. Chronic oral lactate supplementation does not affect lactate disappearance from blood after exercise. *Int. J. Sport Nutr.* 5: 117–124, 1995.
- Coggan, A., and E. F. Coyle. Carbohydrate ingestion during prolonged exercise: effects on metabolism and performance. *Exercise Sport Sci. Rev.* 19: 1–40, 1991.
- Coggan, A. R., and E. F. Coyle. Effect of carbohydrate feedings during high-intensity exercise. *J. Appl. Physiol.* 65: 1703–1709, 1988.
- Coggan, A. R., and E. F. Coyle. Reversal of fatigue during prolonged exercise by carbohydrate infusion or ingestion. *J. Appl. Physiol.* 63: 2388–2395, 1987.
- Coggan, A. R., D. L. Habash, L. A. Mendenhall, S. C. Swanson, and C. L. Klen. Isotopic estimation of CO₂ production during exercise before and after endurance training. *J. Appl. Physiol.* 75: 70–75, 1993.
- Costill, D. L., A. Bennett, G. Branam, and D. Eddy. Glucose ingestion at rest and during prolonged exercise. *J. Appl. Physiol.* 34: 764–769, 1973.
- Coyle, E. F., A. R. Coggan, M. K. Hemmert, and J. L. Ivy. Muscle glycogen utilization during prolonged strenuous exercise when fed carbohydrate. *J. Appl. Physiol.* 61: 165–172, 1986.
- Craig, H. The geochemistry of stable isotopes. *Geochim. Cosmochim. Acta* 3: 53–92, 1953.
- Fahey, T. D., J. D. Larsen, G. A. Brooks, W. Colvin, S. Henderson, and D. Lary. The effect of ingesting polylactate or glucose polymer drinks during prolonged exercise. *Int. J. Sport Nutr.* 1: 249–256, 1991.
- Hawley, J. A., S. C. Dennis, and T. D. Noakes. Oxidation of carbohydrate ingested during prolonged endurance exercise. *Sports Med.* 14: 27–42, 1992.
- Hoerr, R. A., Y.-M. Yu, D. A. Wagner, J. F. Burke, and V. R. Young. Recovery of ¹³C in breath from NaH¹³CO₃ infused by gut and vein: effect of feeding. *Am. J. Physiol.* 257 (*Endocrinol. Metab.* 20): E426–E438, 1989.
- Jandrain, B. J., N. Pailikarakis, S. Normand, F. Pirnay, M. Lacroix, F. Mosora, C. Pachiaudi, J. F. Gautier, A. J. Scheen, J. P. Riou, and P. J. Lefebvre. Fructose utilization during exercise in men: rapid conversion of ingested fructose to circulating glucose. *J. Appl. Physiol.* 74: 2146–2154, 1993.
- Leese, G. P., A. E. Nicoll, M. Varnier, J. Thompson, M. J. Rennie. ¹³C-bicarbonate elimination kinetics during different exercise and metabolic conditions. *Eur. J. Clin. Invest.* 24: 818–823, 1994.
- Lefebvre, P. J. From plant physiology to human metabolic investigations. *Diabetologia* 28: 255–263, 1985.
- Mazzeo, R. S., G. A. Brooks, D. A. Schoeller, and T. F. Budinger. Disposal of blood [¹³C] lactate in humans during rest and exercise. *J. Appl. Physiol.* 60: 232–241, 1986.
- Mora, J. Refueling, the facts and myths about fluid and energy replacement. *Triathlete* (July): 42–46, 1991.

23. **Pallikarakis, N., N. Sphiris, and P. Lefebvre.** Influence of the bicarbonate pool and the occurrence of ¹³CO₂ in exhaled air. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 63: 179-183, 1991.
24. **Péronnet, F., E. Adopo, D. Massicotte.** Exogenous substrate utilization during prolonged exercise: studies with ¹³C-labeling. In: *Muscle Fatigue Mechanisms in Exercise and Training*, edited by P. Marconnet, P. V. Komi, B. Saltin, and O. M. Sejersted. Basel: Karger, 1992, vol. 34, p. 195-206. (Medicine and Sport Science Ser.)
25. **Péronnet, F., E. Adopo, D. Massicotte, G. Brisson, and C. Hillaire-Marcel.** Comparison of two methods for computing exogenous substrate oxidation using ¹³C-labeling. *Med. Sci. Sports Exercise* 25: 297-302, 1993.
26. **Péronnet, F., E. Adopo, D. Massicotte, and C. Hillaire-Marcel.** Exogenous substrate oxidation during exercise: studies using isotopic labeling. *Int. J. Sport Med.* 13, *Suppl.*: S123-S125, 1992.
27. **Péronnet, F., and D. Massicotte.** Table on nonprotein respiratory quotient, an update. *Can. J. Sport Sci.* 16: 23-29, 1991.
28. **Pilegaard, H., J. Bangsbo, E. A. Richter, and C. Juel.** Lactate transport studied in sarcolemmal giant vesicles from human muscle biopsies: relation to training status. *J. Appl. Physiol.* 77: 1858-1862, 1994.
29. **Roth, D. A.** The sarcolemmal lactate transporter: transmembrane determinants of lactate flux. *Med. Sci. Sports Exercise* 23: 925-934, 1991.
30. **Sherman, W. M., and D. R. Lamb.** Nutrition during prolonged exercise. In: *Perspective in Exercise Science and Sports Medicine. Prolonged Exercise*, edited by D. R. Lamb and R. Murray. Indianapolis, IN: Benchmark, 1988, vol. 1, p. 213-280.
31. **Stanley, W. C., E. W. Gertz, J. A. Wisneski, D. L. Morris, R. Neese, and G. A. Brooks.** Lactate extraction during net lactate release in legs of humans during exercise. *J. Appl. Physiol.* 60: 1116-1120, 1986.
32. **Stanley, W. C., J. A. Wisneski, E. W. Gertz, R. A. Neese, and G. A. Brooks.** Glucose and lactate interrelations during moderate-intensity exercise in humans. *Metabolism* 37: 850-858, 1988.
33. **Swensen, T., G. Crater, D. R. Bassett, Jr., and E. T. Howley.** Adding polylactate to a glucose polymer drink does not improve endurance. *Int. J. Sports Med.* 15: 430-434, 1994.
34. **Weast, R. C. (Editor).** *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. Boca Raton, FL: CRC, 1989-1990, p. D-278.
35. **Wolfe, R. R., J. R. Allsop, and J. F. Burke.** Glucose metabolism in man: responses to intravenous glucose infusion. *Metabolism* 28: 210-220, 1979.



- .2 Oxidation of selected ^{13}C labeled gluconeogenic precursors ingested along with glucose during prolonged exercise.**

OXIDATION OF SELECTED ^{13}C LABELLED GLUCONEOGENIC PRECURSORS
INGESTED ALONG WITH GLUCOSE DURING PROLONGED EXERCISE

Burelle Y¹., D. Massicotte², M. Lussier¹, C. Lavoie³, C. Hillaire-Marcel², and F. Peronnet¹

- 1 - Département de Kinésiologie, Université de Montréal, CP 6128 Centre Ville, Montréal, P.Q. Canada, H3C 3J7
- 2 - Département de Kinanthropologie, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8
- 3 - Département des Sciences de l'Activité Physique, Université du Québec à Trois Rivières, Québec, G9A 5H7

Running title: Oxidation of exogenous C₃-substrates during exercise

Address for correspondence:

François Péronnet Ph.D., Professeur titulaire

Département de Kinésiologie

Université de Montréal

CP 6128-Centre-Ville,

Montréal P.Q. CANADA H3C 3J7

tel: 514-343-2073 or 615

fax: 514-343-2181

email: Francois.Peronnet@Umontreal.ca

ABSTRACT

The purpose of this experiment was to measure, by using ^{13}C -labeling, the oxidation rate of exogenous lactate, glycerol or alanine (25 g) (C_3 -substrates) ingested along with glucose (25 g) in a 500 mL bolus taken immediately before a prolonged bout of exercise (120 min, $68 \pm 2\%$ VO_2max in 6 male subjects). Over the last 80-min of exercise, the amount of exogenous glucose oxidized was similar irrespective of the C_3 -substrate ingested and ranged between 12.1 and 13.4 g. Alanine oxidation was similar to that of the glucose present in the mixture (13.5 ± 0.6 g), while the oxidation of lactate and glycerol were respectively 37 and 27 % lower over the last 80-min of exercise (8.5 ± 0.7 and 9.9 ± 0.9 g, not significant from each other). When ^{13}C -lactate or ^{13}C -alanine were ingested along with unlabelled glucose, plasma glucose $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ increased from $\sim -20\%$ $\delta^{13}\text{C}$ PDB-1 to maximal values of $\sim -16\%$ $\delta^{13}\text{C}$ PDB-1 reached between 60 and 80 min into the exercise, suggesting that part of the exogenous lactate and alanine was converted into glucose prior to oxidation. However, the comparatively higher $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in expired CO_2 observed when these labelled substrates were ingested suggest that oxidation of plasma glucose arising from ^{13}C -lactate and ^{13}C -alanine was not the major source of $^{13}\text{CO}_2$. These results suggest that direct oxidation of exogenous lactate and alanine in peripheral tissues is an important metabolic fate during prolonged exercise.

Key Words: lactate, glycerol, alanine, oral administration, prolonged exercise, substrate oxidation, gluconeogenesis, stable isotopes.

INTRODUCTION

In a previous study, we have measured, the respective oxidation of exogenous lactate (25 g) and glucose (75 g) ingested simultaneously during exercise using ^{13}C -labeling (45). It was found, that over the 120-min exercise period, the percentage of exogenous glucose and lactate oxidized were similar (48 vs 45 %, respectively). However, because of the small dose of oral lactate that could be tolerated without gastrointestinal discomfort when compared to the dose of glucose, the amount of lactate oxidized was much smaller than that of exogenous glucose (11.1 vs 36.3 g, respectively). In addition, lack of changes in $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in plasma glucose when ^{13}C -lactate was ingested suggested that lactate was directly oxidized by the working muscles, without significant prior conversion into glucose by the liver. However, the enrichment of exogenous lactate used (+62.5 ‰ $\delta^{13}\text{C}$ PDB-1 or 1.1798 ‰ $^{13}\text{C}/\text{C}$), was comparatively low vs the background ^{13}C enrichment. Because of the large dilution of carbon isotopes occurring along the gluconeogenic pathways (23; 24), the conversion of lactate into glucose could have escaped detection. The first purpose of the present study was thus to repeat this experiment using a much larger ^{13}C enrichment of exogenous lactate.

Several other precursors of gluconeogenesis could also be ingested at rest or during exercise. These include alanine, which is the main amino-acid released from the skeletal muscle, and taken-up by the liver during exercise (4; 19), and glycerol, which is released along with fatty acids from triacylglycerol stores (22). No data are available on the effect or metabolic fate of alanine ingested during exercise, although Carlin et al. (11) and Koeslag et al. (25) have shown that alanine could be ingested in very large doses (up to 100 g) during recovery from exercise. In this situation alanine has been shown to reduce ketosis, presumably due to an increase anaplerosis through pyruvate and oxaloacetate. As for glycerol, it can also be ingested in very large doses (54; 55) at rest, in order to increase the osmotic pressure of the blood, and to drain excess water from various organs or tissues such as the brain or eyes (55). This property has also been used in order to increase total body water before exercise (21; 34; 38; 54). However, no

data are available on the metabolic fate of exogenous glycerol administered before or during exercise.

The second purpose of the present study was thus to measure the oxidation rate of exogenous glycerol or alanine (23 g) ingested along with glucose (23 g) during prolonged exercise, using ^{13}C -labeling.

METHODS

Subjects: The experiment was conducted on six active and healthy male subjects. Their age, weight, height and maximal oxygen uptake on cycle ergometer were 22 ± 1 years, 64 ± 2 kg, 175 ± 2 cm, and 4.4 ± 0.2 L/min respectively (mean \pm standard error of the mean). All subjects gave their informed written consent to participate in the study, which was approved by the Institutional Board on the use of human subjects in research. None of them were smoker, heavy drinker, under medication, or were using recreational drugs.

Experimental protocol: Maximal oxygen uptake (VO_2max) and experimental workloads on cycle ergometer (Ergomeca, La Bayette, France), were determined for each subject during a preliminary test session using open-circuit spirometry (1100 Medical Gas Analyser, Marquette Electronics, Milwaukee, WI). Subsequently, all subjects performed at one week intervals at 10:00 AM, six exercises of 120 min duration at a workload corresponding to $68 \pm 2\%$ VO_2max (3.02 ± 0.05 L/min). The last evening meal (7:00 PM: 1,300 kcal, 55 % carbohydrates, 30 % fat, and 15 % proteins), and the morning breakfast (7:30 AM: 800 kcal, 60 % carbohydrates, 30 % fat, and 10 % proteins) were provided to the subjects. In addition, in order to keep a low background ^{13}C enrichment of expired CO_2 , ingestion of carbohydrates from plants with the C_4 photosynthetic cycle, which are naturally enriched in ^{13}C (30), was avoided during the period of experiments. Subjects also refrained from exercising, and from drinking coffee and alcohol, for two days before each experiment.

During the experimental trials, the subjects ingested in a single-blind random fashion, a mixture composed of glucose (Avebe America Inc. Princetown, NJ) (23 g), and either L-lactate (PURAC America; Lincolnshire, IL) (trials 1 and 2), glycerol (Glycerol 64 %: OPODEX, Villeneuve la Garenne, France) (trials 3 and 4) or L-alanine (Boehringer Mannheim Germany) (trials 5 and 6) present in equal amounts (23 g) and dissolved in 500 mL of water. The solutions were ingested as a bolus, five min before the beginning of exercise. During the exercise, water was ingested in order to assure proper hydration (200 mL ingested at 20, 40, 60, and 80 min). Lactate was administered as a mixture of four salts (11 g sodium lactate, 4.5 g potassium lactate, 12 g calcium lactate and 3.4 g magnesium lactate) in order to reduce the amount of each cation ingested along with lactate (45). In addition, the presence of calcium and magnesium, with two positive charges, allowed to somewhat reduce the osmotic pressure of the solution, and avoid the gastrointestinal discomfort associated with lactate ingestion during exercise (18; 45; 61).

¹³C-labeling : In order to measure the respective oxidation of the C₃-substrates and glucose in the mixtures, lactate, alanine or glycerol artificially enriched in ¹³C were ingested along with unlabelled glucose in trials 1, 3, and 5, respectively, while in trials 2, 4, and 6, unlabelled lactate, glycerol, or alanine, respectively, were ingested along with artificially enriched ¹³C-glucose. For this purpose C₃ substrates and glucose naturally poor in ¹³C (in ‰ δ ¹³C PDB-1: lactate: -25.7; glycerol: -29.6; alanine: -22.2; and glucose: -25.2) were ingested with or without addition of artificially enriched [U ¹³C₃]-lactate, [U ¹³C₃]-glycerol, [U ¹³C₃]-alanine, or [U ¹³C₆]-glucose (¹³C/C > 99 %, Isotec, Miamisburg, OH, USA) in order to achieve a final isotopic composition close to + 245 ‰ δ ¹³C PDB-1 (actual value measured by mass spectrometry were : + 243.9, +244.5, +244.0 and + 243.8 ‰ δ ¹³C PDB-1 for lactate, glycerol, alanine, and glucose respectively). These high ¹³C-enrichment of labelled glucose and C₃-substrates provided a very strong signal in expired CO₂, and plasma glucose, vs the comparatively small changes in background enrichment of expired CO₂ observed from rest to exercise (49).

Measurements : Measurements and blood sampling were made at rest before ingestion of exogenous substrates, and at each 20 min during the exercise period. Carbohydrate and fat oxidation were computed from indirect respiratory calorimetry corrected for protein oxidation. For this purpose, carbon dioxide production ($V\text{CO}_2$) and oxygen consumption ($V\text{O}_2$) were measured using open circuit spirometry (10-min and 5-min collection periods at rest and exercise respectively), and urea production was estimated over the observation periods. For this purpose, urea concentration was measured in urine and sweat during exercise. The amount of urine produced over the observation period was measured, and the volume of sweat produced during exercise was estimated from change in body mass, taking into account fluid and glucose + C_3 -substrates intake, weight loss through CO_2 production, and water loss in the lungs (31). For the measurement of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in expired CO_2 , 80-mL samples of expired gases were collected and stored in vacutainers (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) until analysis. Blood samples (6 mL) were withdrawn through a catheter (Baxter Health Care Corp., Valencia, CA) inserted into an antecubital vein at the beginning of experiment, for the measurement of plasma glucose, lactate, glycerol, alanine, insulin, and free fatty-acid concentrations, and for the measurement of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in plasma glucose. Plasma, urine and sweat samples were stored at -80°C until analysis

Plasma glucose, lactate (Sigma Diagnostics, Sigma, Mississauga, Canada), glycerol, alanine, and free fatty-acids (Boehringer Mannheim, Germany) concentrations were measured using spectrophotometric automated assays, while plasma insulin concentration was measured using an automated radioimmunoassay (KTSP-11001, Immunocorp Sciences, Montreal, Canada). Urea concentration in urine and sweat were measured using a Synchron Clinical System (CX7, Beckman, Anaheim, CA)

For the measurement of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in plasma glucose, 1 mL of plasma was first deproteinized with barium hydroxide (1.5 mL, 0.3 N) and zinc sulfate (1.5 mL, 0.3 N). The soluble phase was separated from the protein precipitate by centrifugation (20 min, 3000 g, 4°C), and the remaining protein precipitate was washed with 3 mL of distilled water. The glucose was then separated by double bed ion exchange chromatography by

running the combined supernatants (~ 7 mL) through superposed columns (0.5 x 2 cm) of AG 50W-X8 H⁺ (200-400 mesh) and (0.5 x 2 cm) of AG 1-X8 chloride (200-400 mesh) resins (Biorad, Mississauga, Canada) equilibrated and eluted with distilled water. The solution obtained (~10 ml) was evaporated to dryness (Virtis Research Equipment, New York, NY). The average percent recovery of glucose was ± 3 %. The eluate was then combusted for 60 min at 400 °C, in presence of copper oxide (20 mg) and the CO₂ recovered was analyzed by mass spectrometry. This procedure was validated by Wolfe et al. (68) and yields similar values of ¹³C-glucose enrichment than that obtained by GC-MS, or by the more specific isolation of glucose by crystallization as potassium gluconate. We have also observed that, when comparatively large amounts of lactate was ingested, the material obtained following evaporation is not significantly contaminated by lactate, glycerol or amino-acids (45). This was confirmed in the present experiment when lactate was ingested along with glucose. In addition, no nitrogen was present in the eluate when ¹³C-alanine was ingested along with unlabelled glucose. In contrast, when large amounts of glycerol were administered and accumulated in the plasma, a large contamination was observed, with glycerol concentration in the eluate ranging from 0.01 to 0.44 mM vs 3.6-4.4 mM for glucose. Consequently, this preclude the specific measurement of ¹³C/¹²C in plasma glucose when glycerol and glucose were ingested simultaneously.

Measurements of ¹³C/¹²C in expired CO₂ and CO₂ from combustion of glucose extracted from plasma, were performed by mass spectrometry (Prism, VG, Manchester, UK) following cryodistillation as previously described (2). The isotopic composition was expressed in ‰ difference by comparison with the PDB-1 Chicago Standard: ‰ $\delta^{13}\text{C PDB-1} = ((R_{\text{spl}} / R_{\text{std}}) - 1) \times 1000$, where R_{spl} and R_{std} are the ¹³C/¹²C ratio in the sample and standard (1.12372 ‰), respectively (16).

Protein oxidation was computed from the estimated amount of urea excreted during the exercise period (neglecting the small changes in plasma urea concentration), taking into account that 1 g of urea corresponds to 2.9 g of proteins oxidized (33). Glucose (M_{glucose}) and fatty acids ($M_{\text{fatty acids}}$) oxidation were, then, computed from VO₂

and VCO_2 (48) corrected for the volume of O_2 and CO_2 corresponding to protein oxidation (1.010 and 0.843 L/g respectively) :

$$M_{\text{glucose}} = 4.5850 VCO_2 - 3.2255 VO_2 \quad \text{eq. 1}$$

$$M_{\text{fatty acids}} = -1.7012 VCO_2 + 1.6946 VO_2 \quad \text{eq. 2}$$

with mass in g and volume in L (STPD). The contribution of the oxidation of the various substrates to the energy yield was computed from their respective energy potential at 37 °C (3.87, 9.75, and 4.704 kcal/g; for carbohydrate, fat and proteins respectively (33).

The oxidation rate of exogenous glucose, lactate, glycerol and alanine (M_{exo} , g/min) was computed as follows (49):

$$M_{\text{exo}} = VCO_2 [(R_{\text{exp}} - R_{\text{ref}}) / (R_{\text{exo}} - R_{\text{ref}})] / k \quad \text{eq. 3}$$

where VCO_2 is in LSTPD/min, R_{exp} is the $^{13}C/^{12}C$ observed in expired CO_2 , R_{ref} is the $^{13}C/^{12}C$ in expired CO_2 at rest before exercise, R_{exo} is the $^{13}C/^{12}C$ in the artificially labelled exogenous glucose or C_3 -substrates ingested, and k is the volume of CO_2 provided by the complete oxidation of glucose and C_3 -substrates (in L/g: glucose and lactate: 0.7426; glycerol: 0.7304; alanine: 0.6292). Because of the presence of a large bicarbonate pool in the body, the $^{13}C/^{12}C$ in expired CO_2 only slowly equilibrates with $^{13}C/^{12}C$ in the CO_2 produced in the tissues (42). In order to take into account this delay between $^{13}CO_2$ production in the tissues and at the mouth, the above computations were only made during the last 80 min of exercise.

The amount of unlabelled glucose oxidized was computed by difference between total glucose oxidation computed from VO_2 and VCO_2 , and the amount of exogenous labelled substrate oxidized computed from $V^{13}CO_2$ at the mouth (eq. 3).

Statistics: Data are presented as mean \pm standard error of the mean. The main effects of time and exogenous substrate ingested, as well as time-substrate interactions were tested by repeated-measures analysis of variance (Statistica package). Newman Keuls post-hoc tests were used to identify the location of significant differences ($P \leq 0.05$) when the analysis of variance yielded a significant F ratio.

RESULTS

Results from indirect respiratory calorimetry, urea excretion, and substrate oxidation during the last 80 min of exercise in the six experimental trials are shown in Tables 1 and 2. No significant difference was observed for VO_2 , VCO_2 , and urea excretion, as well as for carbohydrate, fatty-acid, and protein oxidation between the six experimental trials.

Figure 1 shows the ^{13}C enrichment of expired CO_2 at rest before ingestion of the ^{13}C -labelled mixture of glucose and C_3 -substrates, and during the 120-min exercise period. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in expired CO_2 at rest was similar in all experimental trials (-22.7 ± 0.2 ‰ $\delta^{13}\text{C}$ PDB-1: pooled data, $n = 36$). Following ingestion of the various mixtures of glucose and C_3 -substrates, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in expired CO_2 peaked between 60 and 80 min into the exercise period. When ^{13}C -glucose was ingested along with unlabelled C_3 -substrates, changes in $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in expired CO_2 were similar in the three experimental conditions, except for a slightly but significantly higher value at the end of exercise when alanine was ingested along with glucose (Figure 1 *top*). When compared to the respective values observed when ^{13}C -glucose was ingested along with the corresponding unlabelled C_3 -substrates, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in expired CO_2 was significantly lower following ingestion of ^{13}C -lactate and glycerol, but not following ingestion of ^{13}C -alanine (Figure 1 *bottom*). As a consequence $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in expired CO_2 was slightly but significantly higher following ^{13}C -alanine vs ^{13}C -lactate or glycerol ingestion.

The respective oxidation of glucose and C_3 -substrates ingested as a mixture, as well as that of endogenous glucose is shown in Figure 2 for the last 80 min of exercise. Exogenous glucose oxidation was similar in the three experimental situations, and ranged between 12.1 and 13.4 g over the last 80 min of exercise. The oxidation of exogenous ^{13}C -alanine was similar to that of exogenous glucose present in the mixture (13.5 ± 0.6 vs 13.0 ± 0.5 g for alanine and glucose respectively). In contrast the oxidation of ^{13}C -lactate and ^{13}C -glycerol, which were not significantly different from each other (8.5 ± 0.7 and 9.9 ± 0.9 g respectively), was significantly lower than that of glucose and alanine.

Resting plasma glucose $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ was similar before ingestion of labelled substrates (-19.9 ± 0.5 ‰ $\delta^{13}\text{C}$ PDB-1, pooled data $n = 24$) (Figure 3 *top* and *bottom*). Following ingestion of the mixtures containing labelled glucose and unlabelled lactate or alanine, a rapid rise of plasma glucose $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ was observed (Figure 2 *top*). The peak values, reached between 20 and 60 min of exercise, were significantly higher when lactate was ingested along with glucose, when compared to alanine + glucose ingestion. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in plasma glucose also increased when ^{13}C -labelled lactate or alanine were ingested along with unlabelled glucose (Figure 3 *bottom*). However, the peak values were reached over the second hour of exercise and were much lower than those observed when ^{13}C -glucose was ingested, with maximal values not exceeding -16 ‰ $\delta^{13}\text{C}$ PDB-1.

Changes in plasma metabolite and insulin concentrations are shown in Figure 4. Ingestion of the glucose + lactate mixture led to a modest but significant increase in plasma lactate concentration during the first 60 min of exercise. Only small increases in plasma glycerol or alanine concentrations were observed during exercise when these substrates were not ingested. In contrast, large increases in plasma glycerol and alanine concentrations were observed when these substrates were ingested, with peak values at 40 min into exercise reaching 2.2 ± 0.3 and 1.8 ± 0.2 mM. Plasma glucose concentration remained stable throughout the experiment and no significant differences were observed between the three experimental conditions. In response to exercise, plasma insulin decreased in a similar fashion in all trials. As for plasma free fatty-acid concentration, a progressive increase was observed in response to exercise. At the end of exercise, plasma free fatty-acid concentration was slightly higher in the glucose + lactate trials.

DISCUSSION

Oxidation of exogenous glucose: In the present experiment, the amount of glucose ingested along with exogenous lactate, alanine, and glycerol was small (23 g) compared to that ingested in other reports on the oxidation of exogenous glucose during exercise (9; 43; 52). Over the last 80 min of exercise, the amount of exogenous glucose oxidized was similar in the three experimental conditions, and averaged 12.8 ± 0.5 g. These data are in line with the only study in which such a low amount of glucose was

ingested. Indeed, Péronnet et al. (46) reported that the amount of exogenous glucose oxidized was 13.0 ± 4.2 g when 30 g of glucose was ingested immediately before the beginning of a 90-min period of exercise at 68 % VO_2max . This observation suggests that adding comparatively large amounts of C_3 -substrates to a glucose drink does not appear to interfere with glucose absorption and oxidation. This probably stems from the fact that intestinal absorption of glucose, as well as entry of glucose into the muscle cell, depend on selective transport mechanisms, which are different from those involved in the transport of lactate (50; 56), alanine (13; 53; 57) and glycerol (32).

Oxidation of ^{13}C -lactate: In the present experiment, when 23 g of ^{13}C -lactate were ingested along with 23 g of unlabelled glucose in a single bolus immediately before the beginning of exercise, the amount of exogenous lactate oxidized averaged 8.4 ± 0.6 g over the last 80-min period of exercise. This result is in line with our previous report (45) indicating that over a 120-min period of exercise, 11.1 g of exogenous lactate were oxidized when ingested along with glucose (lactate: 25 g; glucose 75 g) in several portions during the exercise period. In this study by Péronnet et al. (45), the amount of exogenous lactate oxidized during the exercise period was ~ 3 fold lower than that of the glucose contained in the mixture (11.1 vs 36.3 g). This was at least partly due to the fact that a much larger amount of glucose was ingested compared to lactate. In the present experiment, the amount of glucose ingested was similar to the amount of lactate ingested (23 g). However, the oxidation of exogenous glucose was again significantly higher than the amount of exogenous lactate oxidized (13.4 ± 0.5 vs 8.5 ± 0.7 g). This result indicates that for similar amounts administered orally, lactate is less readily available for oxidation than glucose. This could be due to a slower intestinal absorption of lactate vs glucose, since lactate salt ingestion has been reported to cause gastro-intestinal discomfort because of the comparatively high osmotic pressure exerted (18; 45; 61). It could also be related to the different metabolic fate of exogenous lactate vs exogenous glucose.

Two major pathways exist for the oxidation of lactate ingested during prolonged exercise. These pathways are similar to those which can be followed by lactate produced in tissues such as the red blood cells or muscles during exercise. The first pathway is the

direct complete oxidation of lactate that can occur in any tissue where oxygen is consumed and the redox potential favours the conversion of lactate into pyruvate, including at least some of the exercising muscles and the heart (7). The second pathway involves the conversion of lactate into glucose, which mainly occurs in the liver, and the subsequent oxidation of this neoformed glucose in peripheral tissues (7).

In our previous experiment, we failed to observe any enrichment of plasma glucose when ^{13}C -labelled lactate was ingested, and we concluded that the major portion of lactate was directly oxidized in peripheral tissues without prior conversion into glucose in the liver or kidneys. These observations were in line with results from studies on the metabolic fate of lactate during prolonged exercise. Indeed, both in rats (8) and humans (35; 60), lactate released from exercising muscles during prolonged exercise has been shown to be oxidized mainly in other tissues, with only a small portion being converted into glucose in the liver (~ 20 %).

However, in our previous experiment, the enrichment of the lactate ingested was comparatively low (+62.5 ‰ $\delta^{13}\text{C}$ PDB-1 or 1.1798 ‰ $^{13}\text{C}/\text{C}$). It is well known that when ^{13}C -pyruvate, lactate, and alanine, are converted into glucose, an important isotopic dilution occurs. This is due to the fact that the labelled precursor is diluted within large pools of endogenous unlabelled precursors (28; 44). It is also due to the exchanges occurring between labelled and unlabelled carbons at the level of oxaloacetate, which is a common intermediate of the gluconeogenic pathway and the Krebs cycle (23; 24). The end result is that the ^{13}C enrichment of the neoformed glucose is much lower than that of the labelled precursor. In addition, since a large amount of unlabelled glucose was ingested along with labelled lactate, the extent of dilution was even greater. These phenomenon's explain that although a portion of exogenous lactate was probably converted into glucose prior to its oxidation in peripheral tissues, no significant changes in plasma glucose $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ were observed in our previous study (45).

In the present experiment, much higher enrichments of exogenous substrates (including lactate) were used (e.g. 243.9 ‰ $\delta^{13}\text{C}$ PDB-1 or 1.3785 ‰ $^{13}\text{C}/\text{C}$ for ^{13}C -

lactate) and the amount of exogenous glucose ingested along with labelled lactate was much lower (23 vs 75 g). Under this condition, we observed a small but significant increase in plasma glucose enrichment, with $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ plateauing at about $-17\text{‰ } \delta^{13}\text{C}$ PDB-1 over the last hour of the exercise period vs $-20.5\text{‰ } \delta^{13}\text{C}$ PDB-1 at rest. This observation indicates that at least a portion of the exogenous lactate load was converted into glucose, presumably in the liver, prior to its oxidation in peripheral tissues. Uncertainty concerning the overall "dilution factor" precludes any quantification of the amount of lactate which was actually converted into glucose, from ^{13}C -glucose enrichment. However, two lines of evidence suggest that direct oxidation of exogenous lactate was quantitatively much more important than the oxidation of glucose derived from ^{13}C -lactate released by the liver. The first evidence is that $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in expired CO_2 paralleled changes in $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in plasma glucose (Figure 1 *bottom* vs Figure 3 *bottom*). Since $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in expired CO_2 tracks $^{13}\text{CO}_2$ production in tissues with a 15-20 min delay (42), this suggests that conversion of ^{13}C -lactate into glucose did not precede ^{13}C -lactate oxidation. The second evidence is that the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio in expired CO_2 , when ^{13}C -lactate was ingested, was similar and even slightly higher than that of plasma glucose throughout the exercise period. Given the fact that ^{13}C arising from the oxidation of labelled substrates is diluted by a large amount of ^{12}C arising from the oxidation of endogenous substrates, such a small difference between the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ of plasma glucose and CO_2 can only occur if a significant amount of ^{13}C -lactate is directly oxidized without being first converted into glucose. Indeed, if all the ^{13}C -lactate was converted to glucose prior to its oxidation, the extent of dilution between the ^{13}C enrichment in plasma glucose and expired CO_2 would have been closer to what was observed in the present experiment when ^{13}C -glucose was ingested along with unlabelled lactate (Figure 1 *top* and 3 *top*).

Oxidation of ^{13}C -alanine: In the present experiment the metabolic fate of exogenous alanine was studied because it has been shown that, during prolonged exercise, alanine is the main amino-acid released by the active muscle, and taken-up by the liver for gluconeogenesis (so called glucose-alanine cycle: 4; 12; 19; 67).

Only a limited number of studies have looked at the metabolic fate of exogenous alanine either infused (1; 6; 64) or administered orally (5; 63; 65). In addition, these studies have been performed at rest or during recovery from exercise, alanine was administered in small amounts (~2-3 g), along with several other amino-acids (except in the studies by Carlin et al. (11), and Koeslag et al., (25) in which 100 and 50 g of alanine was ingested alone respectively), and its oxidation was not directly measured. In the present experiment, the much higher amount of alanine administered was well tolerated, with no subjects complaining of gastrointestinal discomfort. In addition, the rapid and large increase in plasma alanine concentration indicate that alanine was quickly absorbed in the blood. Exogenous alanine was also readily available for oxidation. Indeed, over the last 80 min of exercise, 13.5 ± 0.6 g of ^{13}C -alanine were oxidized (59 % of the load), this amount being similar to that of glucose present in the mixture (13.0 ± 0.5 g).

The significant increase of plasma glucose $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ during exercise when ^{13}C -alanine was ingested indicates that at least a portion of the alanine load was converted into glucose by the liver. However, plasma glucose $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ increased more slowly and plateaued later when compared to $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in expired CO_2 . In addition, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in plasma glucose when ^{13}C -alanine was ingested (-16.9 ± 0.4 ‰ $\delta^{13}\text{C}$ PDB-1), was significantly lower than that of expired CO_2 over the entire period of exercise (-12.0 ± 0.4 ‰ $\delta^{13}\text{C}$ PDB-1). As suggested for exogenous lactate, this indicates that a comparatively large amount of $^{13}\text{CO}_2$ was provided by direct alanine oxidation in peripheral tissues, with only a minor fraction being converted into glucose prior to oxidation.

Comparison of the amount of alanine oxidized in the present experiment with data in literature concerning the contribution of gluconeogenesis from alanine during prolonged exercise, also suggests that conversion into glucose was probably a minor metabolic route for exogenous alanine. Indeed, for an exercise of comparable intensity and duration than used in the present experiment (~ 65 % VO_2max , 120 min), hepatic glucose production has been shown to be ~ 50-60 g (14; 36; 37), and gluconeogenesis from alanine has been shown to only account for only ~ 2 % of total glucose production

(1-1.2 g) in 12-14 h fasted humans (3; 4; 19). These contribution of alanine to liver gluconeogenesis are based on arterio-venous difference across the hepato-splanchnic bed, and, accordingly, could be minimal estimates of the amount of alanine that could have been converted into glucose in the present experiment. Indeed, alanine uptake and conversion into glucose by the liver is dependent upon portal and hepatic artery alanine concentration (66). In the present experiment, because of the very large oral alanine load and rapid absorption, plasma alanine concentration (average value: 1.38 ± 0.06 mM) was about 5-6 fold higher than the normal concentrations observed during exercise. Accordingly the amount of alanine which has been converted into glucose could have exceeded the value reported in overnight fasted humans (3; 4; 19).

According to the classical glucose-alanine cycle, described in resting fasted conditions (10; 20), and which has also been shown to be operative during prolonged exercise (12; 67), alanine released from muscle tissues, which derives both from glucose and from protein breakdown (12), is taken up by the liver and converted into glucose (3; 4; 19). In this situation, a net efflux of alanine from muscle is, thus, observed. In contrast, data from the present experiment suggest that an important uptake of alanine was present in exercising muscles. At least four systems, involved in the transport of neutral amino-acids, are expressed in the skeletal muscles (systems A, ASC, L, and N^m) (13; 53; 57). Among these, system A and ASC are those mainly involved in alanine transport, while system L has a lower affinity for alanine (13; 57) These transport mechanisms, which can accumulate alanine against a concentration gradient, explain that alanine is taken up by the muscle even when a net alanine release is observed. For example, in the study by Biolo et al. (6) using [2,3,3,3-²H₄]-alanine (among other amino-acid tracers), arterio-venous balance, and muscle biopsy, net leg muscle alanine release was $105 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{ mL leg}^{-1}$, but inward and outward alanine transport rates were 176 and $282 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{ mL leg}^{-1}$, respectively. In the same experiment, when ~ 2.5 g/h of alanine was infused during 3 hours (along with 14 other amino-acids), the inward rate of alanine transport increased by 3.3 fold, and alanine balance across the leg switched from net uptake, to net release (-105 to $8 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{ mL leg}^{-1}$). When amino-acids were infused during recovery from exercise, the inward rate of alanine

transport was further increased (5.5 fold compared to basal value), and net alanine release by the leg was $144 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{ mL leg}^{-1}$. These results are in line with data from Abumrad et al. (1), showing that when $\sim 3 \text{ g}$ of alanine were administered intravenously (along with 14 other amino-acids), net alanine release from forearm tissues decreased by 58 %, and that muscle alanine uptake could account for the disposal of 28 % of the infused load. Tipton et al. (63) have also shown that an increase in amino-acid delivery to the muscle increases the inward amino-acid transport rate following administration of an oral amino-acid load containing 2.4 g of alanine. Taken together these data suggest that when plasma alanine concentration is very high during exercise, such as in the present experiment, inward alanine transport could be increased, thus allowing exogenous alanine to be directly oxidized in the muscle. However, in the absence of data concerning arterio-venous difference across the muscle, it cannot be ascertained whether this is accompanied by a net alanine uptake or release.

Oxidation of ^{13}C -glycerol: Supplementation of large amounts of glycerol before exercise has been used in order to achieve a state of hyperhydration which could be beneficial when exercise is performed in the heat. Indeed, glycerol which is rapidly absorbed and well tolerated at oral doses up to 1.0-1.5 g/kg, increases total body water from 494-729 mL, after 2.5 to 4 h of hydration involving 1.4-2.0 L of fluid (21;34; 38; 54). This hyperhydration regimen was shown to be efficient in increasing sweat rate, and reducing rectal temperature during a subsequent bout of prolonged exercise in the heat (34). Glycerol has also been used for almost 60 years with widespread clinical use in the treatment of cerebral oedema, intraocular hypertension, intracranial hypertension, postural syncope, improved rehydration during acute gastrointestinal disease (see ref 55 for a review), and parenteral nutrition (62)

There is however, a paucity of data concerning the metabolic fate of exogenous glycerol, administered in large amounts, either intravenously or orally. When the amount of glycerol administered is sufficient to saturate the pathways of glycerol metabolism, plasma glycerol concentration can increase to very high values, exceeding the renal threshold for glycerol reabsorption of $\sim 1.6 \text{ mM}$ (55). In this situation, a significant

portion of glycerol is loss in urine. For example, in the study by Sommer et al. (58), when 88 g of glycerol was administered orally, plasma glycerol concentration peaked at ~ 19 mM, and over eight hours, 18.9 % of the glycerol load was recovered in urine. However, Olbermann et al. (41) reported that when 3 g glycerol /kg was infused, only 4-6 % of the glycerol load was lost in urine. In this study, the amount of glycerol administered (19-23 g) was similar to the oral glycerol load administered in the present experiment (23 g). The peak plasma glycerol concentration reported by Olbermann et al. (41) was slightly higher (3.9 vs 2.2 mM in the present experiment), probably because of the different mode of administration. It is thus unlikely that more than 1-1.5 g out of the 23 g oral glycerol load administered (4-6 %) was lost in urine in the present experimental conditions. As for the response of plasma glycerol concentration observed during exercise, our data are comparable to those reported by Murray et al. (39). Indeed, in this study, when 26 g of glycerol were ingested during exercise (90 min, 50 % VO_2max), plasma glycerol concentration peaked at 2.8 mM ~ 60 min after glycerol ingestion, compared to 2.2 mM reached after 40 min in the present study. Taken together these results, thus, suggest that the glycerol load administered along with glucose in the present experiment was well absorbed, with probably a negligible fraction being lost in urine.

This partly explains that a large amount of exogenous glycerol was oxidized during the last 80 min of exercise. Indeed, glycerol oxidation (9.9 ± 0.9 g) was similar to that of exogenous lactate (8.5 ± 0.7), and slightly lower than that of exogenous alanine (13.5 ± 0.6 g) and glucose (13.2 ± 0.5 g). Accordingly, in addition to its beneficial effect on thermoregulation during exercise, glycerol could both contribute to energy yield, and help replenish the pool of tricarboxylic acid intermediates, which slowly diminishes over a prolonged period of exercise (59).

It is generally accepted that the liver, and in a lesser manner the kidneys, are the main organs involved in the removal of plasma glycerol (15; 22; 29), because of their substantial glycerol kinase activity (32). It is also believed that the main fate of glycerol in these tissues is conversion into glucose (22). However, this hypothesis is not

supported by some experimental evidence, and is not consistent with data from the present experiment. As soon as in 1983, Hetenyi et al., (22) suggested that in the postabsorptive state at rest, in both humans and dogs, the percentage of endogenous glycerol turnover (R_t) that is converted into glucose ranges only from 24 to 49 %. Two recent studies have reassessed the metabolism of glycerol in overnight fasted dogs (51) and in 60-h fasted humans (27), and concluded that the liver and kidneys were probably not the main sink of plasma glycerol. Using a-v balance and infusion of [$^2\text{H}_5$]-glycerol in anaesthetized dogs, Previs et al. (51) have indeed shown that net uptake of glycerol by the liver and kidneys could only account for 26-30 and 4-9 % of endogenous glycerol R_t , respectively. Landau et al. (27) using a combination of a-v balance and infusion of [$\text{U-}^{13}\text{C}_3$]-glycerol in humans reported similar values, with liver and kidneys glycerol uptake, respectively accounting for 29 and 17 % of glycerol R_t . These authors also reported a significant uptake of glycerol by the forearm tissues. Upon the assumption that forearm muscles were representative of whole body muscle, Landau et al. (27) estimated that the muscle mass (~ 30 % of body weight) could account for ~ 13 % of the glycerol R_t . Uptake of glycerol by the muscle was also reported by Elia et al. (17) and Kurpad et al. (26). These authors infused [$^2\text{H}_5$]-glycerol in overnight fasted subjects, and observed both uptake and dilution of labelled glycerol across the muscle. Data from these studies (17; 26; 27; 51), showing that glycerol could be metabolized in peripheral tissues as well as the liver, are consistent with the observation that glycerol kinase activity is present in vertebrate muscle (40).

In the present experiment, due to limitations in the technique used to isolate plasma glucose, it was not possible to directly assess the conversion of exogenous glycerol into glucose when exogenous glycerol was ingested. However, based on the contribution of glycerol to liver glucose production measured by Alhborg and Bjorkman (3) (about 3.5 % of splanchnic glucose production), and on liver glucose output measured during exercise of comparable intensity and duration than used in the present experiment (50 to 60 g/120 min) (14; 36; 37), it can be estimated that 1.5 to 2 g of glycerol could have been converted into glucose. This value is probably an underestimation of liver glycerol uptake and conversion into glucose because of the

much higher plasma glycerol concentration reached in the present experiment. However, based on the V_{\max} of hepatic glycerol uptake measured by Previs et al. (51) in intact dogs ($6.9 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$), and assuming that this value is comparable to V_{\max} for hepatic glycerol uptake in humans, a maximal estimate of glycerol uptake and conversion into glucose can be made. These data indicate that over the 120-min period of exercise, assuming that the liver was always in the presence of a saturating glycerol concentration, a maximum of 4.4 g of glycerol could have been taken up and converted into glucose. This value is more than 50 % lower than the amount of glycerol which was oxidized over the last 80-min of exercise, suggesting that a significant portion of exogenous glycerol was directly oxidized by peripheral tissues (presumably the working muscles) without prior conversion into glucose by the liver.

REFERENCE

- 1) **Abumrad, N.N., D. Rabin, K.L. Wise, W.W. Lacy.** The disposal of an intravenously administered amino acid load across the human forearm. *Metabolism* 31: 463-470, 1982.
- 2) **Adopo, E., F. Péronnet, D. Massicotte, G. R. Brisson, and C. Hillaire-Marcel.** Respective oxidation of exogenous glucose and fructose given in the same drink during exercise. *J. Appl. Physiol.* 76: 1014-1019, 1994.
- 3) **Ahlborg, G., and O. Björkman.** Splanchnic and muscle fructose metabolism during and after exercise. *J. Appl. Physiol.* 69: 1244-1251, 1990.
- 4) **Ahlborg, G., P. Felig, L. Hagenfeldt, R. Hendler, J. Wahren.** Splanchnic and leg metabolism of glucose, free fatty acids, and amino acids. *J. Clin. Invest.* 53: 1080-1090, 1974.
- 5) **Aoki, T.T., M.F. Brennan, W.A. Muller, J.S. Soeldner, J.S. Alpert, S.B. Saltz, R.L. Kaufmann, M.H. Tan, G.F. Jr Cahill.** Amino acid levels across normal forearm muscle and splanchnic bed after a protein meal. *Am. J. Clin. Nutr.* 29: 340-350, 1976.
- 6) **Biolo, G., K.D. Tipton, S. Klein, R.R. Wolfe.** An abundant supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein. *Am. J. Physiol.* 273: E122-129, 1997.
- 7) **Brooks, G.A.** Current concepts in lactate exchange. *Med. Sci. Sports Exerc.* 23: 895-906, 1991.
- 8) **Brooks, G.A., G.A. Gaesser.** End points of lactate and glucose metabolism after exhausting exercise. *J. Appl. Physiol.* 49: 1057-1069, 1980.
- 9) **Burelle, Y., F. Péronnet, S. Charpentier, C. Lavoie, C. Hillaire-Marcel, and D. Massicotte.** Oxidation of an oral [¹³C]-glucose load at rest and prolonged exercise in trained and sedentary subjects. *J. Appl. Physiol.* 86: 52-60, 1999.
- 10) **Cahill, G.F. Jr.** Protein and amino acid metabolism in man. *Circ. Res.* 38: I109-I114, 1976.
- 11) **Carlin, J.L., E.B. Olson Jr, H.A. Peters, W.G. Reddan.** The effects of post-exercise glucose and alanine ingestion on plasma carnitine and ketosis in humans. *J. Physiol.* 390: 295-303, 1987.

- 12) Carraro, F., A. Naldini, J.M. Weber, R.R. Wolfe. Alanine kinetics in humans during low-intensity exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 26: 348-353, 1994.
- 13) Christensen, H.N. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol. Rev.* 70: 43-77, 1990.
- 14) Coggan, A. R., S. C. Swanson, L. A. Mendenhall, D. L. Habash, and C. L. Kien. Effect of endurance training on hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during prolonged exercise in men. *Am. J. Physiol.* 268: E375-E383, 1995.
- 15) Coppack, S.W., M.D. Jensen, J.M. Miles. In vivo regulation of lipolysis in humans. *J. Lipid. Res.* 35: 177-193, 1994.
- 16) Craig, H. The geochemistry of stable isotopes. *Geochim. Cosmochim. Acta* 3: 53-92, 1953.
- 17) Elia, M., K. Khan, G. Calder, A. Kurpad. Glycerol exchange across the human forearm assessed by a combination of tracer and arteriovenous exchange techniques. *Clin. Sci.* 84: 99-104, 1993.
- 18) Fahey, T.D., J.D. Larsen, G.A. Brooks, W. Colvin, S. Hendersen, D. Lary. The effects of ingesting polylactate or glucose polymer drinks during prolonged exercise. *Int. J. Sports Med.* 1: 249-256, 1991.
- 19) Felig, P., and J. Wahren. Amino acid metabolism in exercising man. *J. Clin. Invest.* 50: 2703-2714, 1971.
- 20) Felig, P., O.E. Owen, J. Wahren, G.F. Jr. Cahill. Amino acid metabolism during prolonged starvation. *J. Clin. Invest.* 48: 584-594, 1969.
- 21) Freund, B.J., S.J. Montain, A.J. Young, M.N. Sawka, J.P. DeLuca, K.B. Pandolf, C.R. Valeri. Glycerol hyperhydration: hormonal, renal, and vascular fluid responses. *J. Appl. Physiol.* 79: 2069-2077, 1995.
- 22) Hetenyi, Jr. G., G. Perez, and M. Vranic. Turnover and precursor-product relationships of nonlipid metabolites. *Physiol. Rev.* 63: 606-659, 1983.
- 23) Hetenyi, Jr. G. Correction for the metabolic exchange of ^{14}C for ^{12}C atoms in the pathway of gluconeogenesis in Vivo. *Federation Proc.* 41: 104-109, 1982.
- 24) Katz, J. Determination of gluconeogenesis in Vivo with ^{14}C -labelled substrates. *Am. J. Physiol.* 248: R391-R399, 1985.

- 25) **Koeslag, J.H., L.I. Levinrad, J.D. Lochner, A.A. Sive.** Post-exercise ketosis in post-prandial exercise: effect of glucose and alanine ingestion in humans. *J. Physiol.* 358: 395-403, 1985.
- 26) **Kurpad, A., K. Khan, A.G. Calder, S. Coppack, K. Frayn, I. Macdonald, M. Elia.** Effect of noradrenaline on glycerol turnover and lipolysis in the whole body and subcutaneous adipose tissue in humans in vivo. *Clin. Sci.* 86: 177-184, 1994.
- 27) **Landau, B. R., J. Wahren, S. F. Previs, K. Ekberg, V. Chandramouli, and H. Brunengraber.** Glycerol production and utilization in humans : sites and quantitation. *Am. J. Physiol.* 271: E1110-1117, 1996.
- 28) **Large, V., M. Soloviev, H. Brunengraber, and M. Beylot.** Lactate and pyruvate isotopic enrichments in plasma and tissues of postabsorptive and starved rats. *Am. J. Physiol.* 268: E880-888, 1995.
- 29) **Larsen, J.M.** Elimination of glycerol as a measure of hepatic blood flow in the cat. *Acta Physiol. Scand.* 57: 224-234, 1963.
- 30) **Lefebvre, P.J.** From plant physiology to human metabolic investigations. *Diabetologia* 28: 255-263, 1985.
- 31) **Lemon, P.W.R. and J.P. Mullin.** Effect of initial muscle glycogen levels on protein catabolism during exercise. *J. Appl. Physiol.* 48:624-629, 1980.
- 32) **Lin, E.C.** Glycerol utilization and its regulation in mammals. *Annu. Rev. Biochem.* 46: 765-795, 1977.
- 33) **Livesey, G., and M. Elia.** Estimation of energy expenditure, net carbohydrate utilization, and net fat oxidation and synthesis by indirect calorimetry: evaluation of errors with special reference to the detailed composition of fuels. *Am. J Clin. Nutr.* 47: 608-628, 1988.
- 34) **Lyons, T.P., M.L. Riedesel, L.E. Meuli, T.W. Chick.** Effects of glycerol-induced hyperhydration prior to exercise in the heat on sweating and core temperature. *Med. Sci. Sports Exerc.* 22: 477-483, 1990.
- 35) **Mazzeo, R.S., G.A. Brooks, D.A. Schoeller, T.F. Budinger.** Disposal of blood [1-¹³C]-lactate in humans during rest and exercise. *J. Appl. Physiol.* 60: 232-241, 1986.

- 36) **McConell, G., S. Fabris, J. Proietto, and M. Hargreaves.** Effect of carbohydrate ingestion on glucose kinetics during exercise. *J. Appl. Physiol.* 77: 1537-1541, 1994.
- 37) **Mendenhall, L. A., S. C. Swanson, D. L. Habash, and A. R. Coggan.** Ten days of exercise training reduces glucose production and utilization during moderate-intensity exercise. *Am. J. Physiol.* 266: E136-E143, 1994.
- 38) **Montner, P., D.M. Stark, M.L. Riedesel, G. Murata, R. Robergs, M. Timms, T.W. Chick.** Pre-exercise glycerol hydration improves cycling endurance time. *Int. J. Sports Med.* 17: 27-33, 1996.
- 39) **Murray, R., D.E. Eddy, G.L. Paul, J.G. Seifert, G.A. Halaby.** Physiological responses to glycerol ingestion during exercise. *J. Appl. Physiol.* 71: 144-149, 1991.
- 40) **Newsholme, E.A., K. Taylor.** Glycerol kinase activities in muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem. J.* 112: 465-474, 1969.
- 41) **Olbermann, M., A. Grunert, K.H. Bassler.** Biokinetic characterization of human glycerin utilization. *Infusionsther. Klin. Ernahr.* 4: 68-70, 1977.
- 42) **Pallikarakis, N., N. Sphiris, and P. Lefebvre.** Influence of the bicarbonate pool on the occurrence of $^{13}\text{CO}_2$ in exhaled air. *Eur. J. Appl. Physiol.* 63: 179-183, 1991.
- 43) **Pallikarakis, N., B. Jandrain, F. Pirnay, F. Mosora, M. Lacroix, A.S. Luyckx, P.J. Lefebvre.** Remarkable metabolic availability of oral glucose during long-duration exercise in humans. *J. Appl. Physiol.* 60: 1035-1042, 1986.
- 44) **Peroni, O., V. Large, M. Odeon, M. Beylot.** Measuring glycerol turnover, gluconeogenesis from glycerol, and gluconeogenesis with [2- ^{13}C]-glycerol: role of infusion and sampling mode. *Metabolism* 45: 987-901, 1996.
- 45) **Péronnet, F., Y. Burelle, D. Massicotte, C. Lavoie, and C. Hillaire-Marcel.** Respective oxidation of ^{13}C -labelled lactate and glucose ingested simultaneously during exercise. *J. Appl. Physiol.* 82: 440-446, 1997.
- 46) **Péronnet, F., E. Adopo, D. Massicotte, G. Brisson, C. Hillaire-Marcel.** Comparison of two methods for computing exogenous substrate oxidation using ^{13}C -labeling. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25: 297-302, 1993.

- 47) **Péronnet, F., E. Adopo, D. Massicotte, and C. Hillaire-Marcel.** Exogenous substrate oxidation during exercise: studies using isotopic labeling. *Int. J. Sports Med.* 13: S123-125, 1992.
- 48) **Péronnet, F., and D. Massicotte.** Table of non protein respiratory quotient: an update. *Can. J. Spt. Sci.* 16: 23-29, 1991.
- 49) **Péronnet, F., D. Massicotte, C. Hillaire-Marcel, and G. Brisson.** Use of ¹³C-substrates for metabolic studies in exercise: methodological considerations. *J. Appl. Physiol.* 69: 1047-1052, 1990.
- 50) **Pilegaard, H., J. Bangsbo, E.A. Richter, C. Juel.** Lactate transport studied in sarcolemmal giant vesicles from human muscle biopsies: relation to training status. *J. Appl. Physiol.* 77: 1858-1862, 1994.
- 51) **Previs, S. F., K. S. Martin, J. W. Hazey, M. V. Soloviev, A. P. Keating, D. Lucas, F. David, J. Koshy, D. W. Kirschenbaum, K.-Y. Tserng, and H. Brunengraber.** Contributions of liver and kidneys to glycerol production and utilization in the dog. *Am. J. Physiol.* 271: E1118-E1124, 1996.
- 52) **Rehrer, N.J., A.J. Wagenmakers, E.J. Beckers, D. Halliday, J.B. Leiper, F. Brouns, R.J. Maughan, K. Westerterp, W.H. Saris.** Gastric emptying, absorption, and carbohydrate oxidation during prolonged exercise. *J. Appl. Physiol.* 72: 468-475, 1992.
- 53) **Rennie, M.J., A. Ahmed, S.E. Khogali, S.Y. Low, H.S. Hundal, P.M. Taylor.** Glutamine metabolism and transport in skeletal muscle and heart and their clinical relevance. *J Nutr.* 126: 1142S-1149S, 1996.
- 54) **Riedesel, M.L., D.Y. Allen, G.T. Peake, K. Al-Qattan.** Hyperhydration with glycerol solutions. *J. Appl. Physiol.* 63: 2262-2268, 1987.
- 55) **Robergs, R.A., S.E. Griffin.** Glycerol. Biochemistry, pharmacokinetics and clinical and practical applications. *Sports Med.* 26: 145-167, 1998.
- 56) **Roth, D.A.** The sarcolemmal lactate transporter: transmembrane determinants of lactate flux. *Med. Sci. Sports Exerc.* 23: 925-934, 1991.
- 57) **Shotwell, M.A., M.S. Kilberg, D.L. Oxender.** The regulation of neutral amino acid transport in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 737: 267-284, 1983.

- 58) **Sommer, S., R. Nau, E. Wieland, H.W. Prange.** Pharmacokinetics of glycerol administered orally in healthy volunteers. *Arzneimittelforschung* 43: 744-747, 1993.
- 59) **Spencer, M.K., Z. Yan, A. Katz.** Carbohydrate supplementation attenuates IMP accumulation in human muscle during prolonged exercise. *Am. J. Physiol.* 261: C71-76, 1991.
- 60) **Stanley, W.C., J.A. Wisneski, E.W. Gertz, R.A. Neese, G.A. Brooks.** Glucose and lactate interrelations during moderate-intensity exercise in humans. *Metabolism* 37: 850-858, 1988.
- 61) **Swensen, T. G. Crater, D.R. Bassett, E.T. Howley.** Adding polylactate to a glucose polymer solution does not improve endurance. *Int. J. Sports. Med.* 15: 430-434, 1994.
- 62) **Tao, R.C., R.E. Kelley, N.N. Yoshimura, F. Benjamin.** Glycerol: its metabolism and use as an intravenous energy source. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* 7: 479-488, 1983.
- 63) **Tipton, K.D., A.A. Ferrando, S.M. Phillips, D. Doyle Jr, R.R. Wolfe.** Postexercise net protein synthesis in human muscle from orally administered amino acids. *Am. J. Physiol.* 276: E628-34, 1999.
- 64) **Volpi, E., A.A. Ferrando, C.W. Yeckel, K.D. Tipton, R.R. Wolfe.** Exogenous amino acids stimulate net muscle protein synthesis in the elderly. *J. Clin. Invest.* 101: 2000-2007, 1998.
- 65) **Wahren, J., P. Felig, L. Hagenfeldt.** Effect of protein ingestion on splanchnic and leg metabolism in normal man and in patients with diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 57: 987-999, 1976.
- 66) **Wasserman, D.H., P.E. Williams, D.B. Lacy, D.R. Green, A.D. Cherrington.** Importance of intrahepatic mechanisms to gluconeogenesis from alanine during exercise and recovery. *Am. J. Physiol.* 254: E518-525, 1988.
- 67) **Williams, B.D., D.L. Chinkes, R.R. Wolfe.** Alanine and glutamine kinetics at rest and during exercise in humans. *Med. Sci. Sports Exerc.* 30:1053-1058, 1998.
- 68) **Wolfe, R.R., J.R. Allsop, and J.F. Burke.** Glucose metabolism in man: responses to intravenous glucose infusion. *Metabolism* 28: 210-220, 1979.

Table 1: Heart rate, VO_2 and VCO_2 at rest and during the last 80 min of exercise, and average urea production rate during exercise in the six experimental trials

Trial #		VO_2 (L/min)		VCO_2 (L/min)		Urea (g/min)
		Rest	40-120 min	Rest	40-120 min	0-120 min
1	$^{13}\text{C}\text{-glu}\text{-}^{12}\text{C}\text{-la}$	0.43 ± 0.02	3.10 ± 0.19	0.35 ± 0.01	2.57 ± 0.15	0.04 ± 0.004
2	$^{12}\text{C}\text{-glu}\text{-}^{13}\text{C}\text{-la}$	0.44 ± 0.03	3.00 ± 0.20	0.36 ± 0.01	2.52 ± 0.15	0.04 ± 0.003
3	$^{11}\text{C}\text{-glu}\text{-}^{12}\text{C}\text{-gly}$	0.42 ± 0.02	3.06 ± 0.15	0.37 ± 0.02	2.61 ± 0.14	0.05 ± 0.003
4	$^{12}\text{C}\text{-glu}\text{-}^{11}\text{C}\text{-gly}$	0.43 ± 0.03	2.99 ± 0.14	0.40 ± 0.03	2.50 ± 0.11	0.05 ± 0.005
5	$^{11}\text{C}\text{-glu}\text{-}^{12}\text{C}\text{-ala}$	0.45 ± 0.02	2.97 ± 0.18	0.39 ± 0.01	2.50 ± 0.14	0.07 ± 0.01
6	$^{12}\text{C}\text{-glu}\text{-}^{11}\text{C}\text{-ala}$	0.43 ± 0.03	3.00 ± 0.13	0.38 ± 0.03	2.59 ± 0.10	0.05 ± 0.004

Values are means ± SE

Table 2: Average substrate oxidation computed from indirect respiratory calorimetry, corrected for protein oxidation during the last 80 min of exercise period in the six experimental trials.

Trial #		Carbohydrate (g/min)	Fatty-acids (g/min)	Proteins (g/min)
1	$^{13}\text{C}\text{-glu}\text{-}^{12}\text{C}\text{-la}$	141 ± 12	66 ± 6	10 ± 1
2	$^{12}\text{C}\text{-glu}\text{-}^{13}\text{C}\text{-la}$	145 ± 14	61 ± 8	10 ± 1
3	$^{13}\text{C}\text{-glu}\text{-}^{12}\text{C}\text{-gly}$	160 ± 18	57 ± 7	11 ± 1
4	$^{12}\text{C}\text{-glu}\text{-}^{13}\text{C}\text{-gly}$	140 ± 10	62 ± 6	11 ± 1
5	$^{13}\text{C}\text{-glu}\text{-}^{12}\text{C}\text{-ala}$	142 ± 13	58 ± 7	15 ± 2
6	$^{12}\text{C}\text{-glu}\text{-}^{13}\text{C}\text{-ala}$	166 ± 8	52 ± 5	11 ± 1

Values are means ± SE

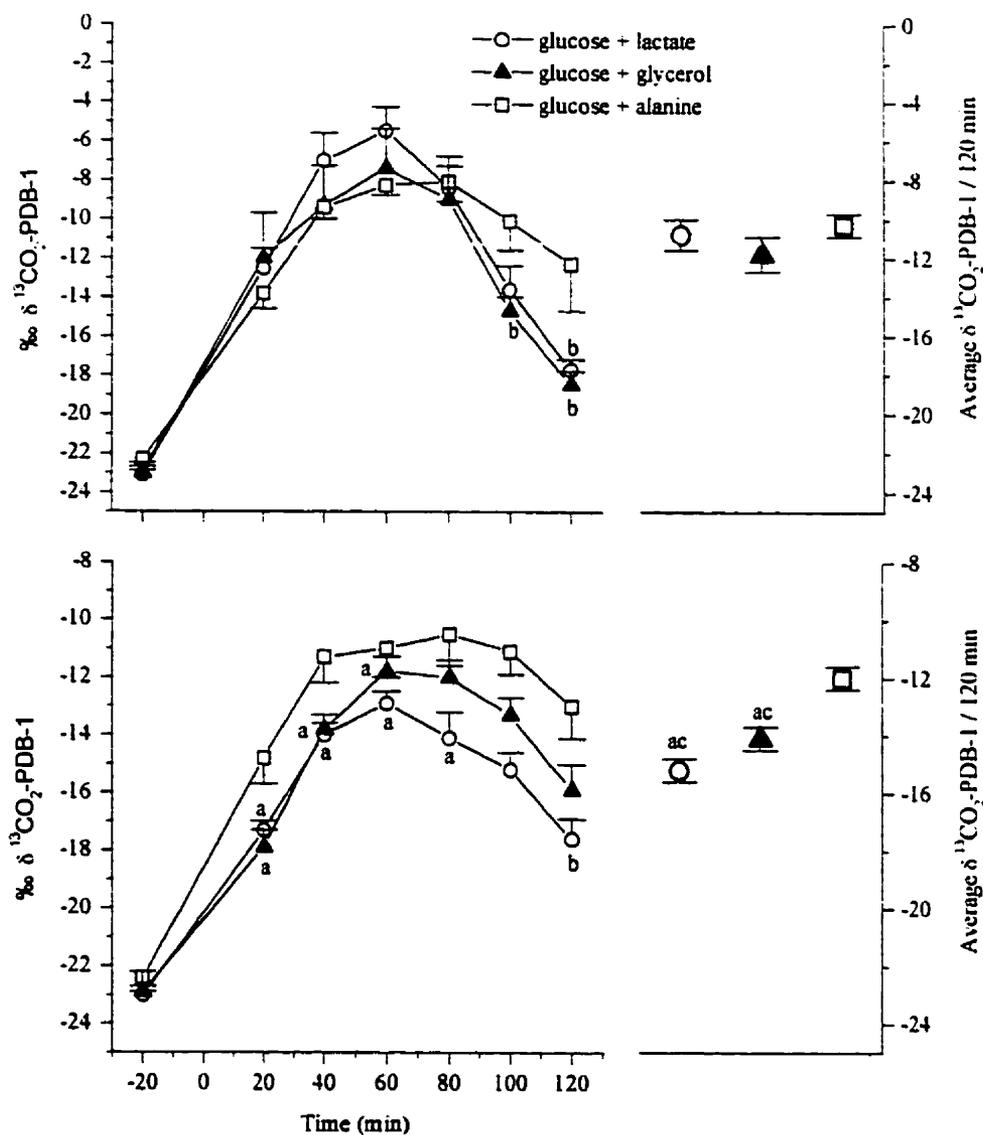


Figure 1: Kinetics and average values of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio in expired CO_2 observed during exercise when ^{13}C -glucose was ingested along with various unlabeled C_3 -substrates (*top*) and when unlabeled glucose was ingested along with ^{13}C -substrates (*bottom*). Values are means \pm SE observed in trials 1 to 6. a: significantly different from ^{13}C -glucose in the same trial; b: significantly different from ^{13}C -glucose + ^{12}C -alanine trial; c: significantly different from ^{12}C -glucose + ^{13}C -alanine; $P \leq 0.05$.

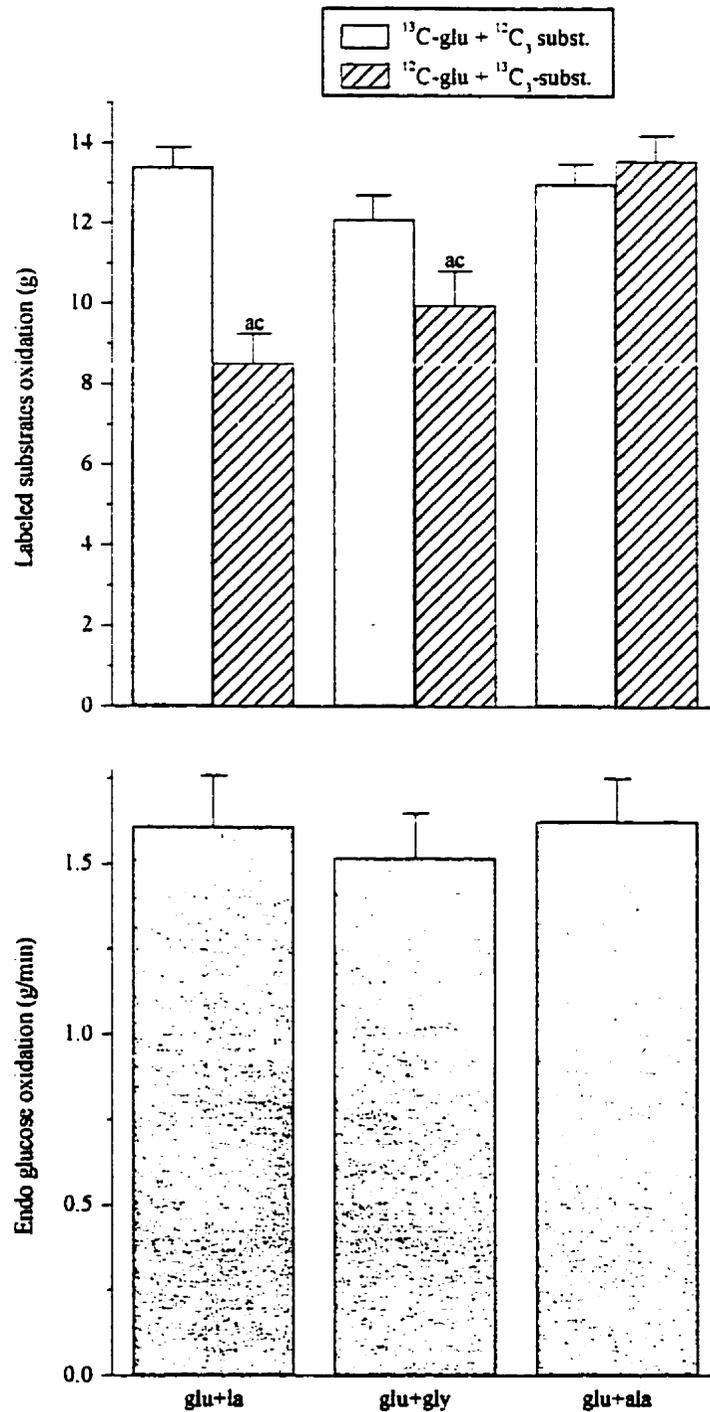


Figure 2: Oxidation of exogenous ^{13}C -labeled glucose and C_3 -substrates as well as of endogenous glucose observed during the last 80-min of exercise. Endogenous glucose oxidation was computed by difference between total carbohydrate oxidation and the sum of exogenous glucose and C_3 -substrate oxidation. Values are means \pm SE. a: significantly different from ^{13}C -glucose in the same trial; c: significantly lower than ^{13}C -alanine; $P \leq 0.05$.

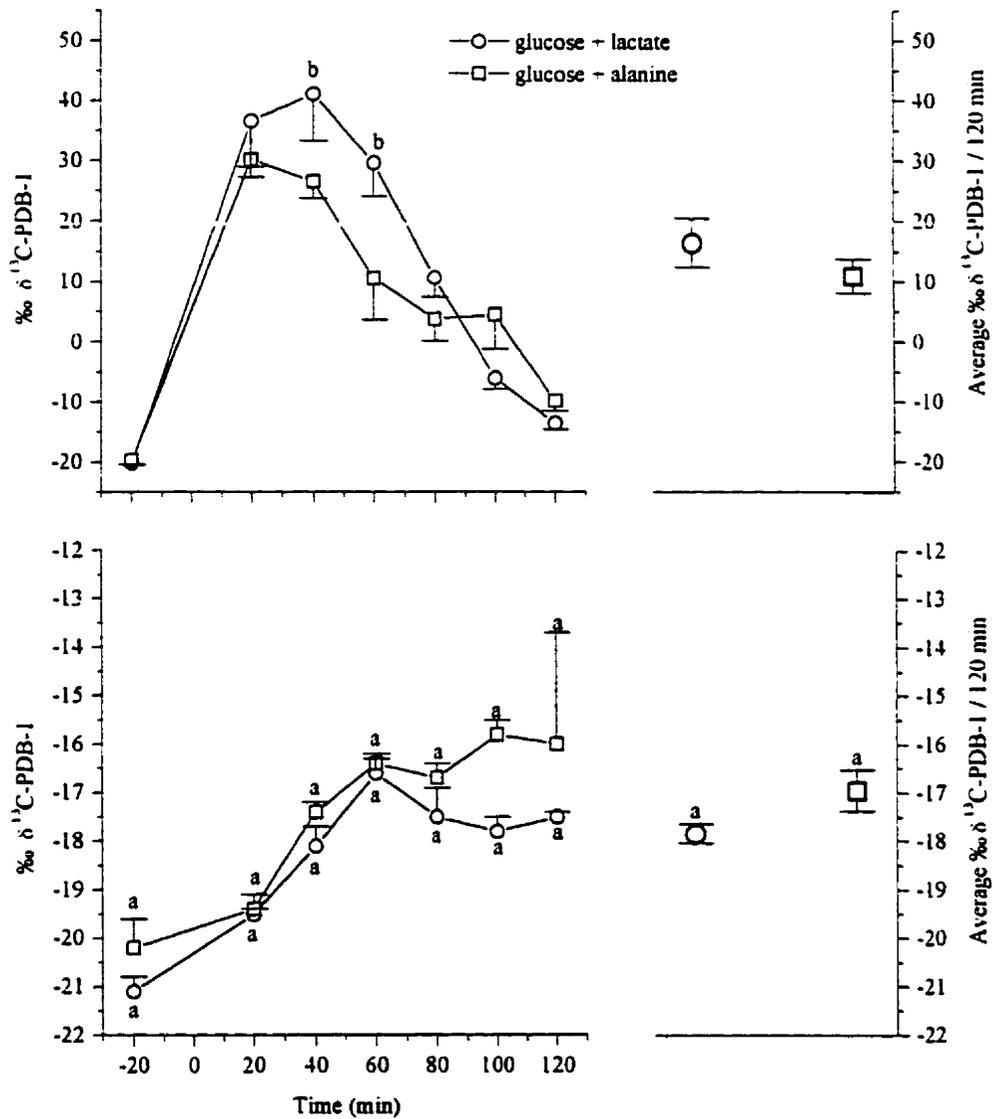


Figure 3: Kinetics and average values of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio in plasma glucose observed during exercise when ^{13}C -glucose was ingested along with various unlabelled C_3 -substrates (*top*) and when unlabelled glucose was ingested along with $^{13}\text{C}_3$ -substrates (*bottom*). Values are means \pm SE observed in trials 1,2 and 5,6. a: significantly different from glucose in the same trial; b: significantly different from ^{13}C -glucose + ^{12}C -alanine; $P \leq 0.05$.

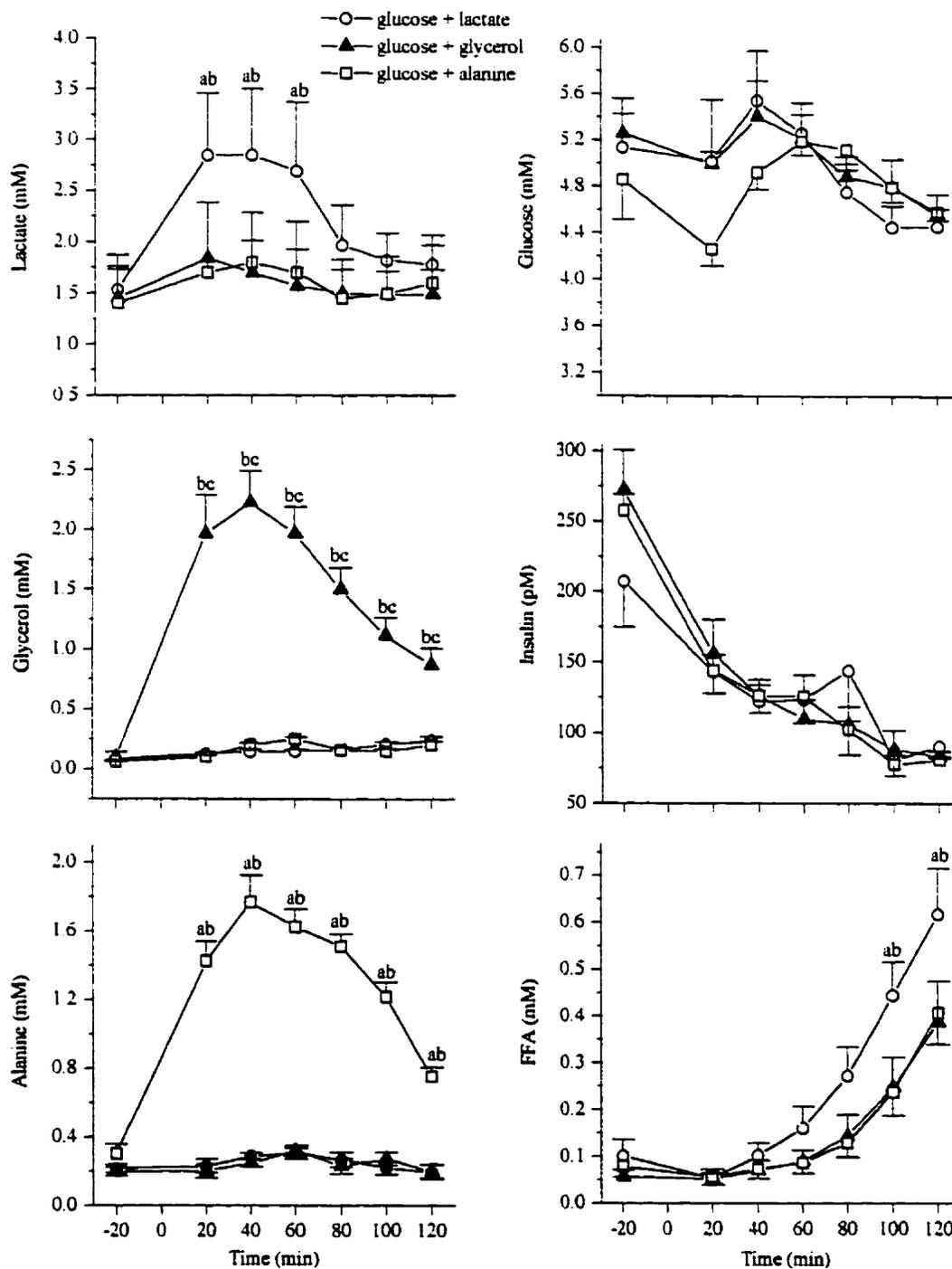


Figure 4: Plasma C_3 -substrate (top to bottom left), glucose, insulin and free fatty acid (top to bottom right) concentration observed in response to exercise in the three experimental conditions. For the three experimental conditions, the values reported are pooled data for the two identical trials. a: significantly different from glucose + alanine; b: significantly different from glucose + glycerol; c: significantly different from glucose + lactate; $P \leq 0.05$.

- .3 Oxidation of an oral [¹³C]-glucose load at rest and prolonged exercise in trained and sedentary subjects**

Oxidation of an oral [^{13}C]glucose load at rest and prolonged exercise in trained and sedentary subjects

199

Y. BURELLE,¹ F. PÉRONNET,¹ S. CHARPENTIER,¹ C. LAVOIE,²
C. HILLAIRE-MARCEL,³ AND D. MASSICOTTE³

¹Département de Kinésiologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3J7;

²Département des Sciences de l'Activité Physique, Université du Québec à Trois Rivières, Trois Rivières, Québec, G9A 5H7; and ³Département de Kinanthropologie, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

Burelle, Y., F. Péronnet, S. Charpentier, C. Lavoie, C. Hillaire-Marcel, and D. Massicotte. Oxidation of an oral [^{13}C]glucose load at rest and prolonged exercise in trained and sedentary subjects. *J. Appl. Physiol.* 86(1): 52–60. 1999.—The purpose of this study was to compare the oxidation of [^{13}C]glucose (100 g) ingested at rest or during exercise in six trained (TS) and six sedentary (SS) male subjects. The oxidation of plasma glucose was also computed from the volume of $^{13}\text{CO}_2$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in plasma glucose to compute the oxidation rate of glucose released from the liver and from glycogen stores in periphery (mainly muscle glycogen stores during exercise). At rest, oxidative disposal of both exogenous (8.3 ± 0.3 vs. 6.6 ± 0.8 g/h) and liver glucose (4.4 ± 0.5 vs. 2.6 ± 0.4 g/h) was higher in TS than in SS. This could contribute to the better glucose tolerance observed at rest in TS. During exercise, for the same absolute workload [140 ± 5 W: TS = 47 ± 2.5 ; SS = 68 ± 3 %maximal oxygen uptake ($\dot{V}\text{O}_{2\text{max}}$)], [^{13}C]glucose oxidation was higher in TS than in SS (39.0 ± 2.6 vs. 33.6 ± 1.2 g/h), whereas both liver glucose (16.8 ± 2.4 vs. 24.0 ± 1.8 g/h) and muscle glycogen oxidation (36.0 ± 3.0 vs. 51.0 ± 5.4 g/h) were lower. For the same relative workload ($68 \pm 3\%$ $\dot{V}\text{O}_{2\text{max}}$: TS = 3.13 ± 0.96 ; SS = 2.34 ± 0.60 l O_2/min), exogenous glucose (44.4 ± 1.8 vs. 33.6 ± 1.2 g/h) and muscle glycogen oxidation (73.8 ± 7.2 vs. 51.0 ± 5.4 g/h) were higher in TS. However, despite a higher energy expenditure in TS, liver glucose oxidation was similar in both groups (22.2 ± 3.0 vs. 24.0 ± 1.8 g/h). Thus exogenous glucose oxidation was selectively favored in TS during exercise, reducing both liver glucose and muscle glycogen oxidation.

exogenous glucose: training; substrate utilization; insulin; stable isotopes

METABOLIC ADAPTATION to training includes a shift toward an increase in fat oxidation (2, 14) and a decrease in plasma glucose turnover and oxidation in response to prolonged exercise (4, 5, 24, 32). However, training has also been shown to improve whole body glucose uptake during oral and intravenous glucose tolerance test, and euglycemic-hyperinsulinemic clamps, because of an increased insulin sensitivity and responsiveness (see Ref. 8 for review). In addition, non-insulin-mediated glucose transport in muscle during exercise is larger in trained subjects (39). Thus, despite a lower dependence on carbohydrate oxidation during prolonged exercise, trained subjects could have a greater ability to oxidize

plasma glucose and, therefore, exogenous glucose when it is supplied at rest as well as during exercise.

Only two groups of authors have described the effect of training state on exogenous [^{13}C]glucose oxidation at rest (18) and during exercise (16, 17). After a 6-wk training program at 30–40% maximal oxygen consumption ($\dot{V}\text{O}_{2\text{max}}$), Krzentowski et al. (17, 18) found no difference in the oxidation rate of 100 g of [^{13}C]glucose ingested at rest (35.9 vs. 37.4 g over 7 h) (18) but a significant 10% increase during exercise (~ 28 vs. ~ 31 g over 90 min) (17). In the recent cross-sectional study by Jeukendrup et al. (16), over the last hour of a 120-min exercise period with ingestion of 100 g of glucose, although the difference did not reach statistical significance, the amount of exogenous glucose oxidized was also 10% higher in trained (50 g) than in sedentary subjects (45 g). The effect of training on the oxidation rate of exogenous glucose during exercise for given absolute and relative workloads remains difficult to ascertain, however. In the study by Krzentowski et al. (17), the absolute workload was kept similar before and after training [oxygen uptake ($\dot{V}\text{O}_2$) ~ 1.3 l/min, corresponding to 41 and 32% $\dot{V}\text{O}_{2\text{max}}$ before and after training, respectively]. In the study by Jeukendrup et al. (16), trained and sedentary subjects both exercised at 50% of their respective maximal mechanical power output. As a consequence, both the relative (50 vs. 63% $\dot{V}\text{O}_{2\text{max}}$) and absolute workloads (146 vs. 207 W or 2.2 vs. 2.6 l O_2/min) were different.

The purpose of the present experiment was, thus, to compare the oxidation rate of exogenous glucose ingested at rest as well as during prolonged exercise performed at the same relative and absolute workloads, in trained and sedentary subjects, by using ^{13}C -labeling. In addition, plasma glucose $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ was used to compute the oxidation of plasma glucose. The oxidation of glucose released from the liver was computed by difference between plasma and exogenous glucose oxidation, and the oxidation of glucose released from glycogen in periphery (mainly muscle glycogen during exercise) was computed by difference between total glucose oxidation and plasma glucose oxidation.

METHODS

Subjects. The experiment was conducted on six well-trained endurance cyclists and six healthy but sedentary male subjects with a normal fasting plasma glucose concentration (4.48 ± 0.22 mmol/l; $n = 12$) (Table 1). Sedentary subjects did not regularly take part in any physical activity and had no history of endurance training. All subjects gave their in-

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Table 1. Subject characteristics

	Trained (n=6)	Sedentary (n=6)
Age, yr	20 ± 1	23 ± 1
Height, cm	176 ± 3	177 ± 2
Body mass, kg	69 ± 2	74 ± 3
%Fat	15.3 ± 0.9	16.8 ± 2.0
Lean body mass, kg	58.0 ± 0.8	61.4 ± 1.6
VO _{2max} , l/min	4.61 ± 0.96	3.45 ± 0.90*
W _{max} , W	348 ± 5	215 ± 3*

Values are means ± SE; n, no. of subjects. VO_{2max}, maximal oxygen consumption; W_{max}, maximal workload. %Fat was computed from skinfold measurements (chest, abdomen, and thigh) (35). *Significantly different from trained subjects (P ≤ 0.05).

formed written consent to participate in the study, which was approved by the Institutional Board on the Use of Human Subjects in Research. None of the subjects were smokers, heavy drinkers, under medication, or using recreational drugs.

Assessment at exercise. VO_{2max} and experimental workloads on cycle ergometer (Ergomeca GP 400, La Bayette, France) were determined for each subject during a preliminary test session with the use of open-circuit spirometry (1100 medical gas analyzer, Marquette Electronics, Milwaukee, WI). Subsequently, all subjects performed a 90-min exercise at a workload corresponding to 68 ± 3% VO_{2max} (226 ± 3 vs. 140 ± 5 W for trained and sedentary subjects, respectively). One week later, trained subjects performed a 90-min exercise at a workload identical to that sustained by the sedentary subjects (140 ± 5 W corresponding to 47 ± 2.5% VO_{2max}). For this purpose, trained and sedentary subjects were matched by ranking them on the basis of VO_{2max} in their respective group. The exercises were performed between 9:30 and 11:00 AM in a laboratory with controlled temperature and humidity (21 ± 1°C, 45 ± 5%, respectively).

During each of the experiments, the subjects ingested 1,000 ml of room-temperature water containing 100 g of

[13C]glucose. The drink was given in four equal volumes (25 g of glucose in 250 ml) taken 30 min before the beginning of exercise, immediately after the beginning of exercise, and at 30 and 60 min during the exercise period.

Assessment at rest. The subjects were also studied at rest 1 wk after the last exercise session. The subjects sat comfortably for 3.5 h in a reclining chair (from 8:30 to 12:00 AM). After basal measurements of VO₂ and CO₂ production (VCO₂) and blood sampling, the subjects ingested 100 g of [13C]glucose in a 10% solution (1,000 ml) divided in four equal volumes taken at 30-min intervals. Observations were made between 9:00 and 12:00 AM.

13C-labeling. Naturally labeled glucose (Biopharm, Laval, Canada) was artificially enriched with [U-13C]glucose (13C/C >99%; Isotec, Miamisburg, OH) to achieve a final isotopic composition larger than +25 and +55‰ change (δ) in 13C Pee Dee Belemnite-1 (PDB-1) at exercise and rest, respectively (actual values measured by mass spectrometry: +26.9 and +57.5‰ δ13C PDB-1). This high enrichment of exogenous glucose provided a very strong signal in expired CO₂ and allowed the neglect of the comparatively small changes in background 13C enrichment of expired CO₂ observed in response to exercise (31). The last evening meal before each experiment at rest or exercise (7:00 PM; 1,250 kcal: 70% carbohydrates, 15% fat, and 15% proteins) and the morning breakfast (7:30 AM; 500 kcal: 50% carbohydrates, 35% fat, and 15% proteins) were standardized. In addition, to keep a low background 13C enrichment of plasma glucose and expired CO₂, ingestion of carbohydrates from plants with the C₄ photosynthetic cycle, which are naturally enriched in 13C (19), was avoided 1 wk before and during the period of experiments. Subjects also refrained from exercising and from drinking coffee and alcohol.

Measurements and computations. Measurements and blood sampling were made every 30 min during the experiments conducted at rest and exercise (see Fig. 1). Glucose and fat oxidation were computed from indirect respiratory calorimetry corrected for protein oxidation. For this purpose, VCO₂ and VO₂ were measured by using open-circuit spirometry (10-

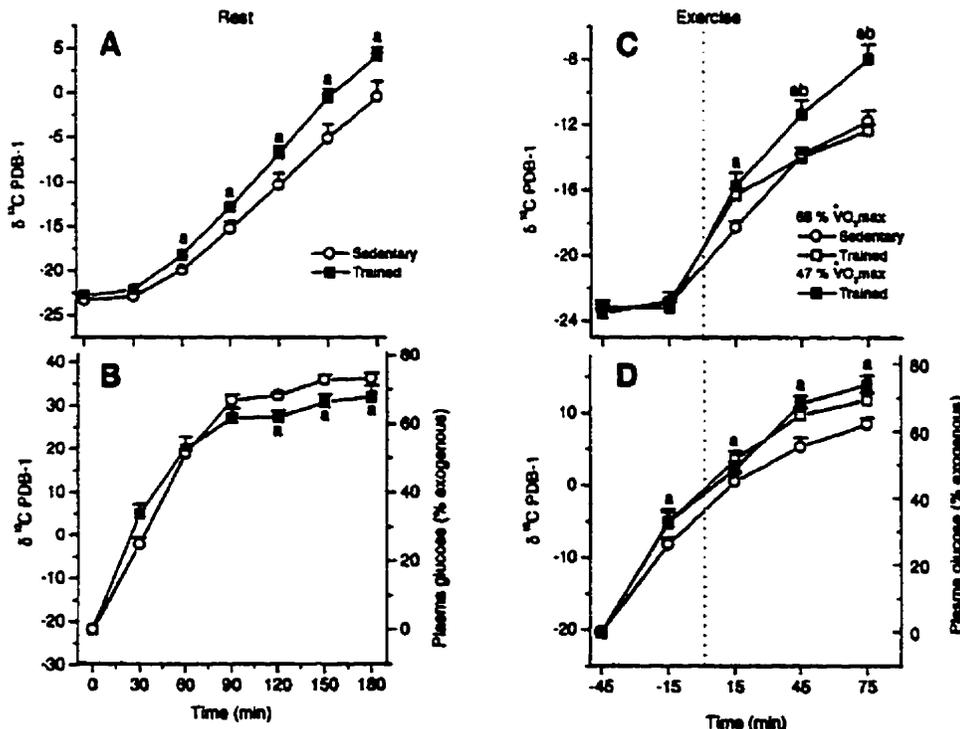


Fig. 1. Isotopic composition of expired CO₂ and of plasma glucose and percentage of plasma glucose derived from exogenous glucose at rest (A and B) and during exercise (C and D), performed at the same relative and absolute workloads in trained and sedentary subjects. Exercise started at time 0. δ13C PDB-1, ‰ difference in 13C Pee Dee Belemnite-1 (PDB-1) standard. Values are means ± SE; a significantly different from sedentary subjects; b significantly different from trained subjects at 68% maximal oxygen consumption (VO_{2max}) (P ≤ 0.05).

and 5-min collection periods at rest and during exercise, respectively), and urea production was estimated over the observation periods. Urea concentration was measured in urine at rest and in urine and sweat during exercise. The amount of urine produced over the observation period (rest or exercise) was measured, and the volume of sweat produced during exercise was estimated from change in body mass, taking into account fluid and glucose intake, weight loss through $\dot{V}\text{CO}_2$, and water loss in the lungs (20). For the measurement of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in expired CO_2 , 80-ml samples of expired gases were collected and stored in vacutainers (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) until analysis. Blood samples (6 ml) were withdrawn at regular intervals through a catheter (Baxter Health Care, Valencia, CA) inserted into an antecubital vein at the beginning of the experiment for the measurement of plasma glucose, lactate, insulin, free fatty acid, and glycerol concentrations and for the measurement of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in plasma glucose. Plasma, urine, and sweat samples were stored at -80°C until analysis.

Plasma glucose, lactate (Sigma Diagnostics, Mississauga, Canada), fatty acid, and glycerol (Boehringer Mannheim, Germany) concentrations were measured by using spectrophotometric automated assays, whereas plasma insulin concentration was measured by using an automated radioimmunoassay (KTSP-11001, Immunocorp Sciences, Montreal, Canada). Urea concentration in urine and sweat was measured by using a Synchron Clinical System (CX7, Beckman, Anaheim, CA).

For the measurement of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in plasma glucose, 1 ml of plasma was first deproteinized with barium hydroxide (1.5 ml, 0.3 N) and zinc sulfate (1.5 ml, 0.3 N). The soluble phase was separated from the protein precipitate by centrifugation (20 min, 3,000 g, 4°C), and the remaining protein precipitate was washed with 3 ml of distilled water. The glucose was then separated by double-bed ion-exchange chromatography by running the combined supernatants (~7 ml) through superposed columns (0.5×2 cm) of AG 50W-X8 H^+ (200–400 mesh) and (0.5×2 cm) of AG 1-X8 chloride (200–400 mesh) resins (Biorad, Mississauga, Canada) equilibrated and eluted with distilled water. The solution obtained (~10 ml) was evaporated to dryness (Virtis Research Equipment, New York, NY). The average percent recovery of glucose was $86 \pm 3\%$. The eluate was then combusted for 60 min at 400°C in the presence of copper oxide (20 mg), and the CO_2 recovered was analyzed by mass spectrometry. This procedure was validated by Wolfe et al. (40) and yielded similar values of ^{13}C glucose enrichment than those obtained by gas chromatography-mass spectrometry or by the more specific isolation of glucose by crystallization as potassium gluconate. We have also observed that the material obtained after evaporation is not significantly contaminated by non-glucose carbons (29).

Measurements of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in expired CO_2 and CO_2 from combustion of glucose extracted from the plasma were performed by mass spectrometry (Prism, VG, Manchester, UK) after cryodistillation, as previously described (1). The isotopic composition was expressed in ‰ difference by comparison with the PDB-1 Chicago standard

$$\% \delta^{13}\text{C PDB-1} = [(R_{\text{sp}}/R_{\text{std}}) - 1] \times 1,000$$

where R_{sp} and R_{std} are the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio in the sample and standard (1.12372‰), respectively (7).

Protein oxidation was computed from the estimated amount of urea excreted during the exercise period (neglecting the small changes in plasma urea concentration), taking into account that 1 g of urea corresponds to 2.9 g of proteins oxidized (21). Glucose (G_{total}) and fatty acid (F_{total}) oxidation rates were then computed from $\dot{V}\text{O}_2$ and $\dot{V}\text{CO}_2$ (30) corrected

for the volume of O_2 and CO_2 corresponding to protein oxidation (1.010 and 0.843 l/g, respectively)

$$G_{\text{total}} = 4.5850 \dot{V}\text{CO}_2 - 3.2255 \dot{V}\text{O}_2 \quad (1)$$

$$F_{\text{total}} = -1.7012 \dot{V}\text{CO}_2 + 1.6946 \dot{V}\text{O}_2 \quad (2)$$

with mass in grams and volume in liters (STPD). The contribution of the oxidation of the various substrates to the energy yield was computed from their respective energy potential at 37°C (3.87, 9.75, and 4.704 kcal/g for carbohydrate, fat, and proteins, respectively (21, 30)).

The oxidation rate of exogenous glucose (G_{exo} , in g/min) was computed as follows (31)

$$G_{\text{exo}} = \dot{V}\text{CO}_2 [(R_{\text{exp}} - R_{\text{ref}})/(R_{\text{exo}} - R_{\text{ref}})] / (k_1 \times k_2) \quad (3)$$

where $\dot{V}\text{CO}_2$ is in liters STPD per minute, R_{exp} is the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ observed in expired CO_2 , R_{ref} is the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in expired CO_2 at rest before exercise, R_{exo} is the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in the artificially labeled exogenous glucose ingested, k_1 (0.7426 l/g) is the volume of CO_2 provided by the complete oxidation of glucose (31), and k_2 is the fractional recovery at the mouth of the CO_2 produced in tissues [0.8 and 1.0 at rest and exercise, respectively (3, 27)]. Because of the presence of a large bicarbonate pool in the body, the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in expired CO_2 only slowly equilibrates with $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in the CO_2 produced in the tissues (27), particularly at rest, because of the small volume of CO_2 produced. To take into account this delay between $^{13}\text{CO}_2$ production in the tissues and at the mouth, the above computations were only made during the last hour of the observation periods, both at rest and during exercise.

Based on the isotopic composition of plasma glucose (R_{glu}), the percentage of plasma glucose derived from exogenous glucose (F_{exo}) and the oxidation rate of blood-borne glucose (G_{blood}) (11) were computed as follows

$$F_{\text{exo}} = [(R_{\text{glu}} - R_{\text{glu-ref}})/(R_{\text{exo}} - R_{\text{glu-ref}})] \times 100 \quad (4)$$

and

$$G_{\text{blood}} = \dot{V}\text{CO}_2 [(R_{\text{exp}} - R_{\text{ref}})/(R_{\text{glu}} - R_{\text{ref}})] / (k_1 \times k_2) \quad (5)$$

where $R_{\text{glu-ref}}$ is the isotopic composition of plasma glucose observed before ingestion of labeled glucose. These values were not significantly different from each other and not significantly different from R_{ref} (see Fig. 1, A and B). The amount of glucose oxidized that was derived from glycogen in peripheral tissues (mainly muscle glycogen during exercise), either directly or through the lactate shuttle, was computed as the difference between the total amount of glucose oxidized (G_{total} , Eq. 1) and the amount of plasma glucose oxidized (G_{blood} , Eq. 5). Finally, the amount of glucose released from the liver that was oxidized was estimated as the difference between G_{blood} and G_{exo} .

Statistics. Data are presented as means \pm SE. The main effects of time and training status as well as time-training status interactions were tested by repeated-measures analysis of variance (Statistica package). Newman-Keuls post hoc tests were used to identify the location of significant differences ($P \leq 0.05$) when the analysis of variance yielded a significant F -ratio.

RESULTS

Observations at rest. When labeled glucose was ingested at rest, the progressive increase in ^{13}C enrichment of expired CO_2 was slightly but significantly faster in trained than in sedentary subjects, and higher

values were reached during the last hour of the 180-min observation period (average values over the last hour: -1.0 ± 0.9 vs. $-5.3 \pm 1.5\%$ $\delta^{13}\text{C}$ PDB-1) (Fig. 1A). The progressive enrichment of plasma glucose was similar in both groups. However, over the last hour of the observation period, the average value was slightly but significantly lower in trained vs. sedentary subjects (29.8 ± 1.8 vs. $34.6 \pm 1.0\%$ $\delta^{13}\text{C}$ PDB-1). Accordingly, the percentage of plasma glucose derived from ingested glucose was slightly but significantly lower in trained subjects (65 ± 2 vs. $71 \pm 1\%$ in sedentary subjects) (Fig. 1B).

Over the last hour of the 3-h observation period at rest, the amounts of proteins, fatty acids, and glucose oxidized were similar in trained and sedentary subjects and contributed 12, 24–34, and 64–54% to the energy yield, respectively (Fig. 2). In contrast, the amounts of exogenous glucose and of glucose derived from the liver (and, thus, the total amount of plasma glucose that was oxidized) were significantly higher in trained than in sedentary subjects.

Changes in plasma glucose and insulin concentrations during the 180-min observation period are depicted in Fig. 3. The peak plasma glucose concentration was higher and was reached later in sedentary than in

trained subjects, and the response of plasma insulin concentration was also markedly higher, although these differences did not reach statistical significance. However, the areas computed under the curve of plasma glucose and insulin concentrations were significantly larger in sedentary than in trained subjects (Fig. 3).

Observations during exercise. For the same relative workload (68 ± 3 and $68 \pm 4\%$ $\text{VO}_{2\text{max}}$ in trained and sedentary subjects, respectively), the mechanical power output and VO_2 were significantly higher in trained than in sedentary subjects (226 ± 3 vs. 140 ± 5 W and 3.13 ± 0.12 vs. 2.35 ± 0.09 l/min, respectively). When the subjects were working at the same workload (140 ± 5 W), the VO_2 was not significantly different in the two groups (2.20 ± 0.08 and 2.35 ± 0.09 l/min for trained and sedentary subjects, respectively).

Over the last hour of the 90-min exercise period, the amount of proteins oxidized was not significantly different in the three experimental conditions (6.0 ± 0.6 and 9.8 ± 1.3 g in trained subjects at 68 and 47% $\text{VO}_{2\text{max}}$; 6.9 ± 0.9 g in sedentary subjects at 68% $\text{VO}_{2\text{max}}$) (Fig. 4). The contribution of protein oxidation to the energy yield remained small and was not significantly different in the three experimental conditions (3–7%).

For the same relative workload (68% $\text{VO}_{2\text{max}}$), the amounts of glucose and fatty acids oxidized were consistently higher in trained than in sedentary subjects (Fig. 4). However, glucose and fatty acid oxidation levels were similar in trained and sedentary subjects when expressed as percentage of the total energy yield (glucose: 56 ± 3 vs. $58 \pm 2\%$; fatty acids: 41 ± 3 vs. $37 \pm 2\%$ for trained and sedentary subjects, respectively).

For the same absolute workload (140 ± 5 W or 47 and 68% $\text{VO}_{2\text{max}}$ in trained and sedentary subjects, respectively), the amount of glucose oxidized was slightly lower in trained subjects, but the difference did not reach statistical significance (Fig. 4). The oxidation of fatty acids was similar in the two groups. The contributions of glucose (53 ± 2 vs. $58 \pm 2\%$) and fatty acid oxidation (40 ± 2 vs. $37 \pm 2\%$) to the energy yield were also similar in trained and sedentary subjects, respectively.

Compared with the values observed in sedentary subjects (33.6 ± 1.2 g), the amount of exogenous glucose oxidized over the last hour of exercise was significantly higher in trained subjects at the same relative (44.4 ± 1.8 g) and absolute workloads (39.0 ± 1.8 g) (Fig. 4). The contribution of exogenous glucose oxidation to the energy yield was similar in trained and sedentary subjects for the same relative workload (17.9 ± 0.6 and $18.0 \pm 0.3\%$, respectively) and significantly higher in trained subjects for the same absolute workload (22.5 ± 1.2 vs. $18.0 \pm 0.3\%$).

The percentage of plasma glucose arising from exogenous glucose, computed from ^{13}C enrichment of plasma glucose, progressively rose from ~30% at 15 min before exercise to ~60–75% during the last 30 min of exercise (Fig. 1D). These values were significantly higher in trained than in sedentary subjects at rest before exercise (33 vs. 26% at 15 min before exercise) as well as at the same relative and absolute workloads (70–74 vs.

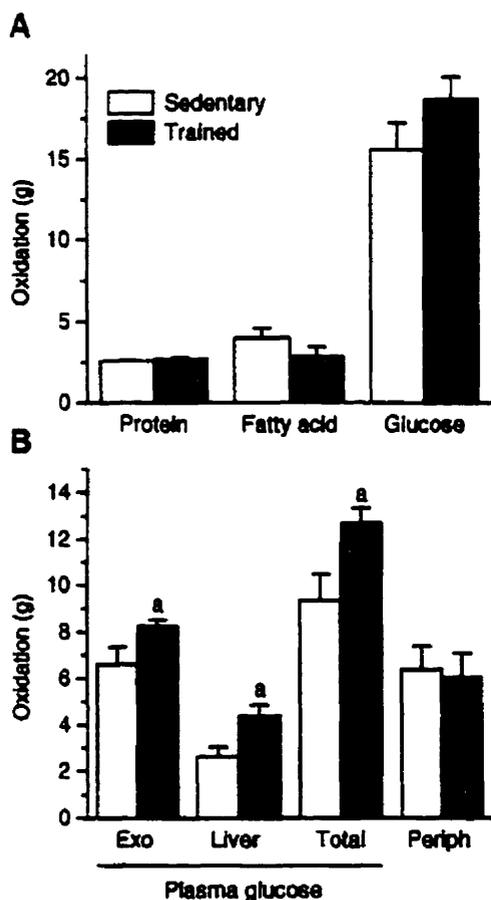


Fig. 2. Total energy substrate oxidation (A) and glucose oxidation (B) over the last hour of 180-min observation period after glucose ingestion at rest. Exo, exogenous; Periph, periphery. Values are means \pm SE; ^asignificantly different from sedentary subjects ($P \leq 0.05$).

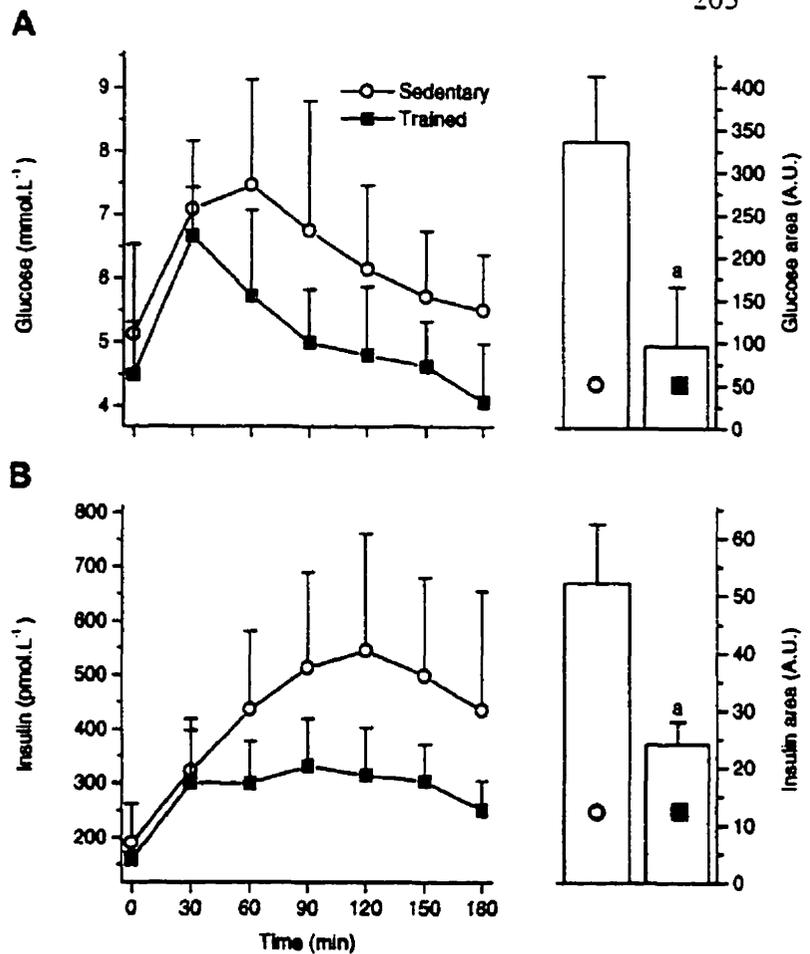


Fig. 3. Plasma glucose (A) and insulin (B) responses and area under curves (A.U., arbitrary units) after glucose ingestion at rest in trained and sedentary subjects. Values are means \pm SE; *significantly different from sedentary subjects ($P \leq 0.05$).

62% over the last 30 min of exercise). For the same relative workload, the amount of liver glucose oxidized over the last hour of exercise was similar in trained and in sedentary subjects (22.2 ± 3.0 vs. 24.0 ± 1.8 g), whereas it was slightly but not significantly lower in trained subjects for the same absolute workload (16.8 ± 2.4 vs. 24.0 ± 1.8 g, $P = 0.1$) (Fig. 4). For the same absolute workload, the amount of glucose arising from muscle glycogen that was oxidized over the last hour of exercise was significantly lower in trained (36.0 ± 3.0 g) than in sedentary subjects (51.0 ± 5.4 g) (Fig. 4). For the same relative workload, a much higher amount was oxidized in trained subjects (73.8 ± 7.2 g).

Changes in plasma glucose, lactate, glycerol, free fatty acid, and insulin concentrations are shown in Fig. 5. After a transient increase in response to glucose ingestion before exercise, plasma glucose and insulin concentrations fell at the onset of exercise and then stabilized around (insulin) or slightly above (glucose) basal values. No significant change in plasma lactate concentration was observed in response to exercise in trained subjects both at 68 and 47% $\text{VO}_{2\text{max}}$, whereas a significant increase was observed in sedentary subjects. Plasma glycerol concentration increased over basal values in response to exercise at 68% $\text{VO}_{2\text{max}}$ in both groups. In contrast, plasma free fatty acid concentration only increased in sedentary subjects exercising at 68% $\text{VO}_{2\text{max}}$.

DISCUSSION

Results from the present experiment indicate that, compared with sedentary subjects, exogenous glucose was oxidized at a higher rate both at rest and at exercise performed at the same relative and absolute workloads in trained subjects. After ingestion of 100 g of ^{13}C -labeled glucose, compared with sedentary subjects, the amount of exogenous glucose oxidized over the last hour of the observation period was 25% higher at rest (8.4 ± 0.3 vs. 6.6 ± 0.8 g), 32% higher for the same relative workload (68% $\text{VO}_{2\text{max}}$: 44.4 ± 1.8 vs. 33.6 ± 1.2 g), and 16% higher for the same absolute workload (140 W or 47 vs. 68% $\text{VO}_{2\text{max}}$: 39.0 ± 1.8 vs. 33.6 ± 1.2 g) in trained subjects.

In the present experiment, compared with sedentary subjects, the response of plasma glucose and insulin concentrations after glucose ingestion at rest were lower in trained subjects. This phenomenon has already been shown, for example, by Lohman et al. (22) and Seals et al. (38) during an oral glucose tolerance test. Results from studies using euglycemic-hyperinsulinemic clamp techniques indicate that this is due to an increased sensitivity and responsiveness to insulin in trained vs. untrained subjects (25, 36) or after training (9). Data from Dela et al. (9) obtained at the first stage of a three-step hyperinsulinemic-euglycemic clamp (plasma insulin concentration = 387 pmol/l, which is

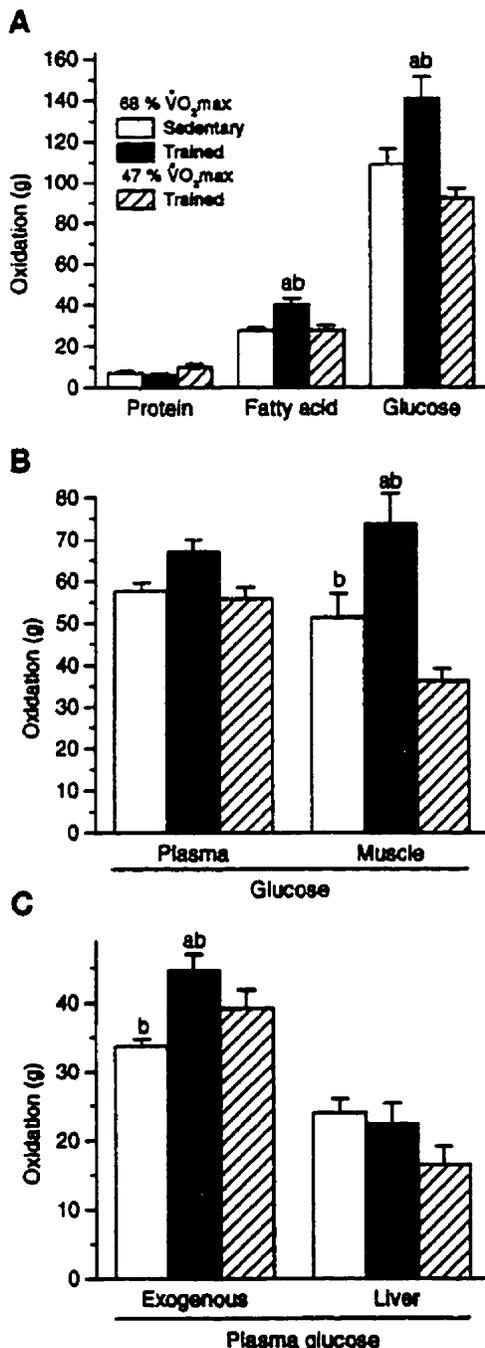


Fig. 4. Total energy substrate oxidation (A), glucose oxidation (B), and blood-borne glucose oxidation (C) over the last hour of 90-min exercise performed at same relative (68% $\dot{V}O_{2max}$) and absolute workloads (140 W: 47 vs. 68% $\dot{V}O_{2max}$ for trained and sedentary subjects, respectively) in trained and sedentary subjects. Values are means \pm SE; * significantly different from sedentary subjects; † significantly different from trained subjects at 47% $\dot{V}O_{2max}$ ($P \leq 0.05$).

comparable to the values observed in the present experiment after glucose ingestion at rest) indicate that the increased sensitivity to insulin in a trained leg was associated with a higher glycogen storage and lactate release and with an increased carbohydrate oxidation compared with the untrained contralateral leg.

The metabolic fate of exogenous glucose administered at rest has been described by several authors. When 100 g of glucose are ingested, the contribution of exogenous glucose to the energy yield ranges between 19 and 27% in nonobese subjects (15, 26, 27, 34), with values significantly lower in obese subjects with a poor glucose tolerance (14%) (34). The effect of training on the oxidative fate of an oral glucose load at rest has only been described by Krzentowski et al. (18). In this longitudinal study, subjects underwent an oral glucose tolerance test (100 g of naturally labeled glucose) before and after 6 wk of moderate exercise training (1 h of cycling, 5 days/wk, 30–40% $\dot{V}O_{2max}$). The amount of exogenous glucose oxidized during the 7-h observation period was not significantly modified (35.9 ± 2.1 vs. 37.4 ± 2.0 g/7 h before and after training, respectively), contributing 27% to the energy yield.

In the present experiment, the average contribution of exogenous glucose oxidation to the energy yield at rest was $22.4 \pm 2.2\%$ in sedentary subjects, but $28.1 \pm 1.1\%$ in trained subjects, with a better glucose tolerance and both lower plasma glucose and insulin responses to the glucose load. This better disposal of exogenous glucose was associated with a higher oxidation rate of both plasma ($\sim 35\%$) and exogenous glucose ($\sim 25\%$). These findings are in line with data from Dela et al. (9) observed at the first stage of a hyperinsulinemic-euglycemic clamp, indicating that glucose uptake and oxidation across the trained leg were $\sim 35\%$ and $\sim 30\%$ higher, respectively. In the study by Dela et al., it was not possible, however, to distinguish between the sources of glucose oxidized: blood-borne glucose vs. muscle glycogen. Results from the present study indicate that the oxidation of blood-borne glucose is actually favored in trained subjects. This phenomenon could in part contribute to the better disposal of an oral glucose load.

The higher oxidation rate of exogenous glucose observed in the present experiment was associated with a slightly lower enrichment of plasma glucose in trained subjects. This could indicate that glucose released from the liver was reduced in a lesser extent after glucose ingestion. No data are presently available to support this suggestion on the effect of training on plasma glucose kinetics at rest during an oral glucose challenge. In the present experiment, the oxidation rate of liver glucose was much higher in trained than in sedentary subjects. However, liver glucose oxidation could not parallel liver glucose output because of possible changes in nonoxidative glucose disposal.

In the longitudinal study by Krzentowski et al. (17), the oxidation of an oral load of 100 g of [^{13}C]glucose was measured over a 90-min exercise bout performed at 40% of the pretraining $\dot{V}O_{2max}$ (1.3 l/min), before and after training. As estimated from their Fig. 4 reported, the average oxidation rate of exogenous glucose over the exercise period was $\sim 10\%$ higher after than before training (~ 0.33 vs. 0.29 g/min), with exogenous glucose contributing ~ 18 and $\sim 22\%$ to the energy yield, before and after training, respectively. Jeukendrup et al. (16) have recently measured the oxidation of glucose ingested during exercise in trained and sedentary sub-

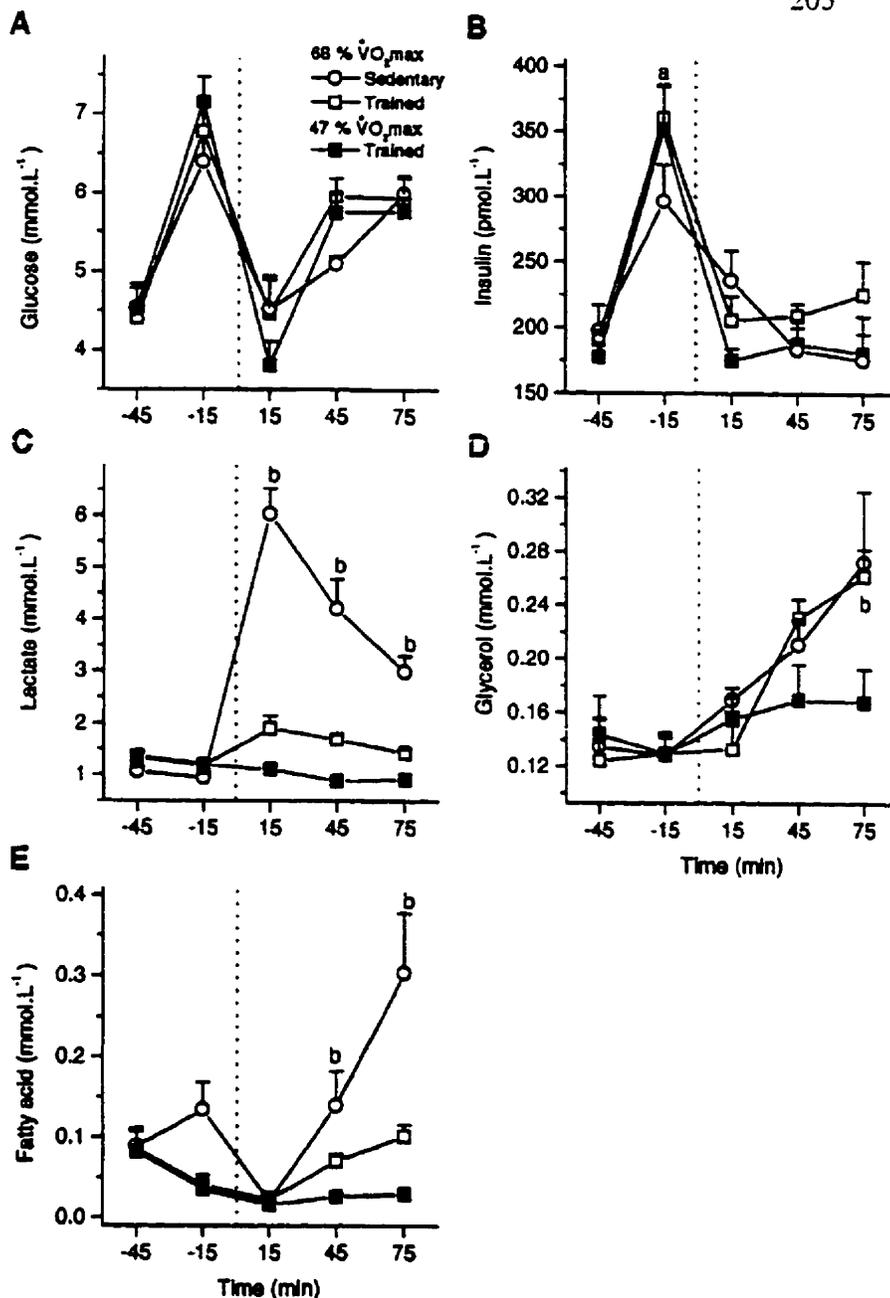


Fig. 5. Plasma glucose (A), insulin (B), lactate (C), glycerol (D), and free fatty acid (E) concentrations at rest and during exercise performed at same relative and absolute workloads in trained and sedentary subjects: exercise started at *time 0*. Values are means \pm SE; *significantly different from sedentary subjects; #significantly different from trained subjects at 47% $\dot{V}O_{2\max}$ ($P \leq 0.05$).

jects. In this study, subjects performed a 120-min bout of cycling at 50% of the maximal mechanical power output (~ 50 and $\sim 63\%$ $\dot{V}O_{2\max}$ in trained and sedentary subjects, respectively) while ingesting 100 g of glucose naturally enriched in ^{13}C . During the last hour of exercise, although the difference did not reach statistical significance, the oxidation rate of exogenous glucose was also $\sim 10\%$ higher in trained than in sedentary subjects.

Results from the present experiment, observed at similar absolute and relative workloads in trained and sedentary subjects, are in line with the early findings by Krzentowski et al. (18) and the more recent findings by Jeukendrup et al. (16). Over the last hour of the 90-min exercise, the average rate of exogenous glucose

was higher in trained subjects for the same relative (0.74 ± 0.04 vs. 0.56 ± 0.02 g/min in sedentary subjects) and absolute workloads (0.65 ± 0.04 vs. 0.56 ± 0.02 g/min in sedentary subjects). Previous work from our laboratory (23) as well as from Pirnay et al. (33) and an analysis of data in literature (29) indicate that the oxidation rate of exogenous glucose during exercise increases with workload and energy expenditure and, for a 100-g load, averages ~ 0.45 g/min and 0.65 g/min for $\dot{V}O_2 = 2.2$ and 3.1 l/min, respectively, contributing $\sim 17\%$ to the energy yield (29). In the present experiment, for a given relative workload (68% $\dot{V}O_{2\max}$), the higher oxidation rate of exogenous glucose observed in trained subjects can thus be explained by a 60% higher workload (226 ± 3 vs. 140 ± 5 W and 3.13 ± 0.12

vs. 2.35 ± 0.09 l O₂/min). In fact, the contribution of exogenous glucose oxidation to the energy yield was similar in both groups (17.9 ± 0.7 vs. $18.0 \pm 0.3\%$ for trained and sedentary subjects, respectively). In contrast, for the same absolute workload (140 ± 5 W), despite similar $\dot{V}O_2$ (2.20 ± 0.08 vs. 2.35 ± 0.09 l/min in trained and sedentary subjects, respectively), the average oxidation rate of exogenous glucose was higher in trained subjects. As a consequence, a larger percentage of the energy yield was derived from exogenous glucose oxidation (22.5 ± 1.2 vs. $18.0 \pm 0.3\%$).

Dela et al. (10) showed that training increases the capacity of skeletal muscle to take up plasma glucose under the combined stimulation of a large dose of insulin (plasma insulin concentration: 18,500 pmol/l) and exercise. However, when plasma insulin remains in a physiological range, glucose uptake during exercise appeared similar in a trained and untrained leg (12, 37). Furthermore, consistent observations (4, 5, 24, 32) show that whole body glucose turnover and utilization for a given absolute workload are actually lower in trained than in sedentary subjects, thus resulting in a significant sparing of liver glycogen stores (5). Results from the present experiment are in line with these findings and indicate that glucose from the liver was oxidized to a lesser extent in trained than in sedentary subjects, even when comparatively large amounts of glucose were ingested during exercise. Indeed, the higher oxidation rate of exogenous glucose observed for a given absolute workload in trained vs. sedentary subjects was not associated with a higher oxidation rate of plasma glucose, which was similar in both groups (0.97 ± 0.03 vs. 0.95 ± 0.08 g/min in trained and sedentary subjects, respectively). Accordingly, the average oxidation rate of glucose released from the liver was 43% lower in trained subjects for a given absolute workload (although this did not reach statistical significance; $P = 0.1$). As expected (6), the oxidation rate of muscle glycogen was significantly (41%) lower. For the same relative workload, despite a much higher energy expenditure and a much higher rate of fatty acid (+45%) and muscle glycogen oxidation (+44%), the oxidation rate of glucose from the liver was similar in both groups (0.37 ± 0.05 vs. 0.40 ± 0.03 g/min in trained and sedentary subjects, respectively).

Taken together, these data indicate that when trained subjects are fed comparatively large amounts of glucose during exercise, the oxidation of exogenous glucose is selectively favored. This phenomenon results in a lower oxidation rate of glucose from the liver and could also contribute to the lower oxidation rate of glucose from muscle glycogen.

This study was supported by grants from the Natural Science and Engineering Research Council of Canada, from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec, and from the Centre de Recherche en Géochimie Isotopique et en Géochronologie, Université du Québec in Montreal.

Address for reprint requests: F. Péronnet, Département de Kinésiologie, Université de Montréal, CP 6128-Centre-Ville, Montréal, PQ, Canada H3C 3J7 (E-mail: peronnet@ere.umontreal.ca).

Received 16 March 1998; accepted in final form 31 August 1998.

REFERENCES

- Adopo, E., F. Péronnet, D. Massicotte, G. R. Brisson, and C. Hillaire-Marcel. Respective oxidation of exogenous glucose and fructose given in the same drink during exercise. *J. Appl. Physiol.* 76: 1014-1019, 1994.
- Brooks, G. A., and J. Mercier. Balance of carbohydrate and fat utilization during exercise: the "crossover" concept. *J. Appl. Physiol.* 76: 2253-2261, 1994.
- Coggan, A. R., D. L. Habash, L. A. Mendenhall, S. C. Swanson, and C. L. Kien. Isotopic estimation of CO₂ production during exercise before and after endurance training. *J. Appl. Physiol.* 75: 70-75, 1993.
- Coggan, A. R., W. M. Kohrt, R. J. Spina, D. M. Bier, and J. O. Holloszy. Endurance training decreases plasma glucose turnover and oxidation during moderate-intensity exercise in men. *J. Appl. Physiol.* 68: 990-996, 1990.
- Coggan, A. R., S. C. Swanson, L. A. Mendenhall, D. L. Habash, and C. L. Kien. Effect of endurance training on hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during prolonged exercise in men. *Am. J. Physiol.* 268 (Endocrinol. Metab. 31): E375-E383, 1995.
- Coggan, A. R., and B. D. Williams. Metabolic adaptations to endurance training: substrate metabolism during exercise. In: *Exercise Metabolism*, edited by M. Hargreaves. Champaign, IL: Human Kinetics, 1995, p. 183.
- Craig, H. The geochemistry of stable isotopes. *Geochim. Cosmochim. Acta* 3: 53-92, 1953.
- Dela, F. On the influence of physical training on glucose homeostasis. *Acta Physiol. Scand.* 158, Suppl. 635: 2-41, 1996.
- Dela, F., K. J. Mikines, M. Von Linstow, N. H. Secher, and H. Galbo. Effect of training on insulin-mediated glucose uptake in human muscle. *Am. J. Physiol.* 263 (Endocrinol. Metab. 26): E1134-E1143, 1992.
- Dela, F., K. J. Mikines, B. Sonne, and H. Galbo. Effect of training on interaction between insulin and exercise in human muscle. *J. Appl. Physiol.* 76: 2386-2393, 1994.
- Derman, K. D., J. A. Hawley, T. D. Noakes, and S. C. Dennis. Fuel kinetics during intense running and cycling when fed carbohydrate. *Eur. J. Appl. Physiol.* 74: 36-43, 1996.
- Henriksson, J. Training-induced adaptation of skeletal muscle and metabolism during submaximal exercise. *J. Physiol. (Lond.)* 270: 661-675, 1977.
- Hoerr, R. A., Y. M. Yu, D. A. Wagner, J. F. Burke, and V. R. Young. Recovery of ¹³C in breath from NaH¹³CO₃ infused by gut and vein: effect of feeding. *Am. J. Physiol.* 257 (Endocrinol. Metab. 20): E426-E438, 1989.
- Holloszy, J. O., and E. F. Coyle. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J. Appl. Physiol.* 56: 831-838, 1984.
- Jandrain, B., G. Krzentowski, F. Pirnay, F. Mosora, M. Lacroix, A. Luyckx, and P. Lefebvre. Metabolic availability of glucose ingested 3 h before prolonged exercise in humans. *J. Appl. Physiol.* 56: 1314-1319, 1984.
- Jeukendrup, A. E., M. Mensink, W. H. M. Saris, and A. J. M. Wagenmakers. Exogenous glucose oxidation during exercise in endurance trained and untrained subjects. *J. Appl. Physiol.* 82: 835-840, 1997.
- Krzentowski, G., F. Pirnay, A. S. Luyckx, M. Lacroix, F. Mosora, and P. J. Lefebvre. Effect of physical training on utilization of a glucose load given orally during exercise. *Am. J. Physiol.* 246 (Endocrinol. Metab. 9): E412-E417, 1984.
- Krzentowski, G., F. Pirnay, A. S. Luyckx, F. Mosora, and P. J. Lefebvre. Effect of physical training on the oxidation of an oral glucose load at rest: a naturally labeled ¹³C-glucose study. *Diabetes Metab.* 9: 112-115, 1983.
- Lefebvre, P. J. From plant physiology to human metabolic investigations. *Diabetologia* 28: 255-263, 1985.
- Lemon, P. W. R., and J. P. Mullin. Effect of initial muscle glycogen levels on protein catabolism during exercise. *J. Appl. Physiol.* 48: 624-629, 1980.
- Livesey, G., and M. Ella. Estimation of energy expenditure, net carbohydrate utilization, and net fat oxidation and synthesis by indirect calorimetry: evaluation of errors with special reference to

- the detailed composition of fuels. *Am. J. Clin. Nutr.* 47: 608-628, 1988.
22. Lohman, D., F. Liebold, W. Heilmann, H. Singer, and A. Pohl. Diminished insulin response in highly trained athletes. *Metab. Clin. Exp.* 27: 521-524, 1978.
 23. Massicotte, D., F. Péronnet, E. Adopo, G. R. Brisson, and C. Hillaire-Marcel. Effect of metabolic rate on the oxidation of ingested glucose and fructose during exercise. *Int. J. Sports Med.* 15: 177-180, 1994.
 24. Mendenhall, L. A., S. C. Swanson, D. L. Habash, and A. R. Coggan. Ten days of exercise training reduces glucose production and utilization during moderate intensity exercise. *Am. J. Physiol.* 266 (*Endocrinol. Metab.* 29): E136-E143, 1994.
 25. Mikines, K. J., B. Sonne, P. A. Farrell, B. Tronier, and H. Galbo. Effect of training on the dose-response relationship for insulin action in men. *J. Appl. Physiol.* 66: 695-703, 1989.
 26. Mosora, F., P. Lefèbvre, F. Pirnay, M. Lacroix, A. Luyckx, and J. Duchesne. Quantitative evaluation of the oxidation of an exogenous glucose load using naturally labeled ¹³C-glucose. *Metabolism* 25: 1575-1582, 1976.
 27. Pallikarakis, N., N. Sphiris, and P. Lefèbvre. Influence of the bicarbonate pool on the occurrence of ¹³CO₂ in exhaled air. *Eur. J. Appl. Physiol.* 63: 179-183, 1991.
 28. Péronnet, F., E. Adopo, D. Massicotte, and C. Hillaire-Marcel. Exogenous substrate oxidation during exercise: studies using isotopic labeling. *Int. J. Sports Med.* 13: S123-S125, 1992.
 29. Péronnet, F., Y. Burelle, D. Massicotte, C. Lavole, and C. Hillaire-Marcel. Respective oxidation of ¹³C-labeled lactate and glucose ingested simultaneously during exercise. *J. Appl. Physiol.* 82: 440-446, 1997.
 30. Péronnet, F., and D. Massicotte. Table of non protein respiratory quotient: an update. *Can. J. Sport Sci.* 16: 23-29, 1991.
 31. Péronnet, F., D. Massicotte, C. Hillaire-Marcel, and G. Brisson. Use of ¹³C-substrates for metabolic studies in exercise: methodological considerations. *J. Appl. Physiol.* 69: 1047-1052, 1990.
 32. Phillips, S. M., H. J. Green, M. A. Tarnopolsky, G. J. F. Heigenhauser, R. E. Hill, and S. M. Grant. Effects of training duration on substrate turnover and oxidation during exercise. *J. Appl. Physiol.* 81: 2182-2191, 1996.
 33. Pirnay, F., A. J. Scheen, J. F. Gautier, M. Lacroix, F. Mosora, and P. J. Lefèbvre. Exogenous glucose oxidation during exercise in relation to the power output. *Int. J. Sports Med.* 16: 456-460, 1995.
 34. Ravussin, E., A. Doerner, K. J. Acheson, P. Pahud, M. J. Arnaud, and E. Jéquier. Carbohydrate utilization in obese subjects after an oral load of 100 g naturally-labelled (¹³C) glucose. *Br. J. Nutr.* 43: 281-288, 1980.
 35. Robergs, R. A., and S. O. Roberts. *Exercise Physiology*. St. Louis, MO: Mosby, 1997, p. 532.
 36. Rosenthal, M., W. L. Haskell, R. Solomon, A. Widstrom, and G. M. Reaven. Demonstration of a relationship between level of physical training and insulin-stimulated glucose utilization in normal humans. *Diabetes* 32: 408-411, 1983.
 37. Saltin, B., K. Nazar, D. L. Costill, E. Stein, E. Jansson, B. Essen, and P. D. Gollnick. The nature of the training response: peripheral and central adaptations to one-legged exercise. *Acta Physiol. Scand.* 96: 289-305, 1976.
 38. Seals, D. R., J. M. Hagberg, W. K. Allen, B. F. Hurley, G. P. Dalsky, A. A. Ehsani, and J. O. Holloszy. Glucose tolerance in young and older athletes and sedentary men. *J. Appl. Physiol.* 56: 1521-1525, 1984.
 39. Tokuyama, K., Y. Higaki, J. Fujitani, A. Kiyonaga, H. Tanaka, M. Shindo, M. Fukushima, Y. Nakai, H. Imura, I. Nagata, and A. Taniguchi. Intravenous glucose tolerance test-derived glucose effectiveness in physically trained humans. *Am. J. Physiol.* 265 (*Endocrinol. Metab.* 28): E298-E303, 1993.
 40. Wolfe, R. R., J. R. Allsop, and J. F. Burke. Glucose metabolism in man: responses to intravenous glucose infusion. *Metabolism* 28: 210-220, 1979.

.4 Mechanisms of increased gluconeogenesis from alanine in rat isolated hepatocytes after endurance training.

Mechanisms of increased gluconeogenesis from alanine in rat isolated hepatocytes after endurance training

Y. BURELLE,¹ C. FILLIPI,² F. PÉRONNET,¹ AND X. LEVERVE²

¹Département de Kinésiologie, Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada H3C 3J7; and ²Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, Université Joseph Fourier, 38041 Grenoble, France

Burelle, Y., C. Fillipi, F. Péronnet, and X. Leverve. Mechanisms of increased gluconeogenesis from alanine in rat isolated hepatocytes after endurance training. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278: E35–E42, 2000.—This work aimed at further investigating the mechanisms by which liver gluconeogenic capacity from alanine is improved after training in rats, with an isolated hepatocyte model. Compared with controls in hepatocytes from trained rats incubated with gluconeogenic precursors (20 mM), the glucogenic flux (J_{glucose}) was increased by 64% from alanine (vs. 21% for glycerol, 18% for lactate-pyruvate 10:1, and 10% for dihydroxyacetone). Maximal intracellular alanine accumulation capacity was also increased by 50%. Further experiments conducted on perfused hepatocytes showed that the putative adaptation at the level of the phosphoenolpyruvate-pyruvate cycle, which could be involved in the increased J_{glucose} from lactate-pyruvate, was not involved in the increased J_{glucose} from alanine after training. For alanine concentration higher than ~1 mM, an increased flux through alanine aminotransferase appeared responsible for the increased J_{glucose} . This could, in turn, depend on an increased supply of cytosolic 2-oxoglutarate because of the higher mitochondrial respiration observed in hepatocytes from trained rats and the activation of the malate-aspartate shuttle. At lower alanine concentration, the increase in J_{glucose} appeared to be entirely due to the improved transport capacity.

phosphoenolpyruvate-pyruvate cycle; alanine aminotransferase; alanine transport; 2-oxoglutarate

ENDURANCE TRAINING results in a better maintenance of blood glucose level during prolonged exercise, both in humans (9, 22, 28) and rats (11, 36). In vivo studies conducted in rats by Turcotte and Brooks (36) and by Donovan and Sumida (11) indicate that this is due to an elevated liver glucose production attributable to a higher rate of gluconeogenesis. Results from studies conducted on perfused liver (10, 33, 34) and incubated liver slices (31) from rat have, in fact, reported increases in maximal gluconeogenic flux from lactate (31, 34) and alanine (33) after endurance training. In contrast, no significant changes were observed with dihydroxyacetone as substrate (33). Because alanine and lactate both enter gluconeogenesis at the level of

pyruvate, Sumida and Donovan (33) suggested that the adaptation of the gluconeogenic pathway to training could occur upstream of the triose phosphates, possibly at the level of the phosphoenolpyruvate-pyruvate cycle. However, these authors did not rule out the possibility that the increased glucose production observed from lactate and alanine could be due to distinct training adaptations for each precursor.

The purpose of the present study was, thus, to further investigate the effect of training on gluconeogenic capabilities from alanine, in isolated hepatocytes. In a first series of experiments, isolated hepatocytes from trained and control rats were incubated with saturating concentrations of various gluconeogenic precursors (lactate-pyruvate, glycerol, dihydroxyacetone, and alanine). Results from these experiments showed that training significantly increased maximal gluconeogenic flux from every substrate tested, particularly from alanine. Alanine transport capacity was then assessed in incubated hepatocytes, and the perfusion technique was used to identify the step(s) involved in the training activation of gluconeogenesis from alanine. Results from these experiments suggest that training-induced increase in gluconeogenesis from alanine is due to both increased transport and transamination into pyruvate.

METHODS

Animal care and training program. The studies were conducted on male Wistar rats (initial weight, ~180 g). Animals were housed in pairs in a room with a 12:12-h light-dark cycle and were fed regular rodent lab chow with water ad libitum.

Trained animals swam in pairs in circular tanks (90 cm in diameter, filled to a depth of ~60 cm with water at 35°C agitated with compressed air) 5 days/wk for a period of 4 wk. Swimming duration was progressively increased from 30 min during the first week to 210 min during the fourth week. Data from Taguchi et al. (35) indicate that this swimming protocol results in significant training adaptations, as evidenced, for example, by a 25–30% increase in succinate dehydrogenase activity in the extensor digitorum longus and the deep portion of the vastus lateralis. Control animals were handled daily and were placed in water (35°C) for 10 min 5 day/wk.

Isolation of hepatocytes. Observations were performed 72 h after the last training session, after a 16-h fast. The rats were anesthetized with sodium pentobarbitate (10 mg/100 g body wt ip), and the hepatocytes were isolated according to the method of Berry and Friend (5) as modified by Groen et al. (17). Briefly, the portal vein was cannulated, and a 2-min

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

anterograde perfusion with Ca^{2+} -free Krebs-Ringer bicarbonate buffer (25 ml/min; 37°C, pH = 7.4, continuously gassed with 95% O_2 -5% CO_2) was performed to remove blood from the liver. A 10-min retrograde perfusion (25 ml/min) through the posterior vena cava was started with the same perfusion medium. Subsequently, a recirculating perfusion was performed (20 min at 40 ml/min) with 100 ml Krebs-Ringer medium supplemented with 0.25 mg/ml collagenase (type IV, Sigma, St. Louis, MO). The liver was then cut and shaken in the perfusion medium for 2 min under constant gassing (95% O_2 -5% CO_2). Finally, the cell suspension was filtered through nylon gauze (pore size, 120 μm), washed twice with Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing 1.6 mM Ca^{2+} , and then washed for a third time with the same buffer supplemented with 1% BSA.

Incubation in closed vials. Liver cells (final concentration 10 mg dry cells/ml) were incubated in closed vials for 45 min in 2.8 ml Krebs-Ringer bicarbonate buffer (in mM: 120 NaCl, 4.8 KCl, 1.2 KH_2PO_4 , 1.2 MgSO_4 , 24 NaHCO_3 , and 2.4 Ca^{2+} , pH = 7.4) saturated with 95% O_2 -5% CO_2 and maintained at 37°C. Incubations were performed with either no exogenous substrate or the following gluconeogenic precursors in saturating concentrations: alanine (20 mM), lactate-pyruvate (20–2 mM), dihydroxyacetone (DHA, 20 mM), or glycerol (20 mM). BSA-oleate (2%-2 mM) was added to the incubation medium except when glycerol was the substrate because gluconeogenesis from this precursor is entirely controlled by the redox potential (6, 25, 39). Every 15 min, 300- μl samples of the cell suspension were taken and deproteinized with HClO_4 (final concentration, 5% mass/vol). After centrifugation (2 min, 14,000 g), the supernatant was removed and neutralized with KOH and (2*N*)-3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid (0.3 M) for subsequent glucose assay. When DHA was the substrate, lactate and pyruvate were also assayed, to estimate the flux through pyruvate kinase (3).

Alanine transport in incubated hepatocytes. Liver cells were preincubated during 20 min as described in *Incubation in closed vials*, but aminooxyacetate (1 mM) was added as a transaminase inhibitor. At time 0, alanine (2 mM) was added, and sampling of the cell suspension was performed at 0.5, 1, 1.5, 4, 7, 10, and 15 min. To measure intra- and extracellular alanine concentrations, samples were placed in 1.5-ml Eppendorf tubes containing 500 μl of a Ringer solution with glucose 6-phosphate (10 mM). After a 15-s centrifugation at 10,000 g , a 400- μl sample of the supernatant was deproteinized with HClO_4 (final concentration, 5% mass/vol) and neutralized. The remaining supernatant was discarded, and the pellet was immediately deproteinized with 250 μl HClO_4 (10% mass/vol) + 25 mM EDTA. After the pellet was resuspended and centrifuged, the acid-soluble intracellular content was separated and neutralized. Intra- and extracellular alanine and glucose 6-phosphate concentrations were determined fluorimetrically (Jobin Yvon, Longjumeau, France) as described by Bergmeyer (4). The amount of glucose 6-phosphate recovered in the acid-soluble intracellular fraction was measured. This value was used for computing the volume of extracellular adherent fluid remaining in the pellet (0.81 ± 0.03 ml/g dry cells), to correct for contamination by extracellular alanine.

Perfusion of hepatocytes. Liver cells were perfused according to the method of van der Meer and Tager (37) modified by Groen et al. (17) as previously described (2). Hepatocytes (225–250 mg dry mass) were placed in 15-ml perfusion chambers at 37°C and were perfused (5 ml/min) with a continuously gassed (95% O_2 -5% CO_2) Krebs-Ringer bicarbonate solution (pH = 7.4) containing 0.2% BSA and 0.2 mM oleate. The experiments were carried out in duplicate in two

perfusion chambers placed in parallel. At the chamber outlet, perfusate O_2 content was monitored with Clark electrodes (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH) to assess O_2 uptake of the hepatocyte suspension. After 40 min, when O_2 uptake had reached a steady state, alanine was infused into the chamber at a constant rate to obtain several successive steady states with increasing alanine concentrations (0.15, 0.30, 0.60, 1.2, 2.4, 4.8, and 9.6 mM).

At each steady state, three samples (5 ml) of the perfusate were taken at 2-min intervals for subsequent determination of glucose, lactate, pyruvate, acetoacetate, and β -hydroxybutyrate concentrations. Samples were stored at 4°C and analyzed within 12 h after the end of the experiment. In addition, 300 μl of the cell suspension were sampled from the chamber for intra- and extracellular fractionation as described in *Alanine transport in incubated hepatocytes*.

Finally, another 300- μl sample was removed for cellular fractionation. For this purpose, mitochondrial and cytosolic spaces were separated with the digitonin fractionation method described by Zuurendonk and Tager (42). Briefly, the cell suspension was placed in a 2.2-ml Eppendorf tube in an isotonic medium containing 2 mM of digitonin (Merck, Lyon, France) at 4°C. After 15 s, the tube was centrifuged for 15 s at 10,000 g to precipitate mitochondria through the underlying 800- μl layer of silicon oil (Waker AR 200, Munich, Germany) into 250 μl HClO_4 (10% mass/vol) + 25 mM EDTA. The supernatant (700 μl) was immediately removed, deproteinized with HClO_4 (5% mass/vol), and neutralized.

Glucose 6-phosphate in intra- and extracellular fractions, intracellular alanine, and cytosolic phosphoenolpyruvate and 3-phosphoglycerate concentrations in neutralized acid-soluble cytosolic fraction were measured fluorimetrically (Jobin Yvon) as described by Bergmeyer (4).

RESULTS

Gluconeogenesis in isolated incubated hepatocytes. When hepatocytes isolated from trained and control animals were incubated with no substrate or with various gluconeogenic precursors, a linear increase in glucose concentration was observed over time in the incubation medium, as shown in Fig. 1, *left*, for lactate-pyruvate and for alanine as examples. The glucose accumulation rate (glucose flux or J_{glucose}) was significantly higher for hepatocytes from trained vs. control rats when no gluconeogenic precursor was added to the cell suspension (endogenous J_{glucose} : 0.93 ± 0.13 vs. 0.44 ± 0.06 $\mu\text{mol} \cdot \text{g dry cells}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Much higher J_{glucose} (corrected for endogenous J_{glucose}) was observed when gluconeogenic precursors were provided to the cells (Fig. 1, *right*), but the significant difference between trained and control groups remained. The largest differences were observed with alanine and glycerol (64 and 21%, respectively, vs. 18% with lactate-pyruvate and 10% with DHA).

When DHA was provided as gluconeogenic precursor, lactate-pyruvate concentration was measured in the incubation medium. The concentration appeared larger with hepatocytes from trained vs. control rats (26.2 ± 4.6 vs. 20.8 ± 2.4 $\mu\text{mol/g dry cells}$ after 45 min), although the difference did not reach statistical significance (not shown).

Effect of training on alanine transport. Figure 2, *left*, shows the accumulation of intracellular alanine over time when 2 mM alanine was added to the cell suspen-

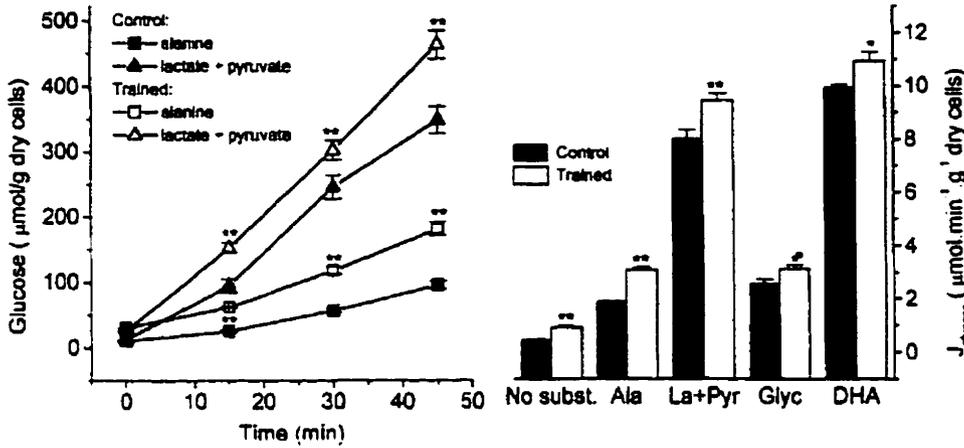


Fig. 1. Effect of training on gluconeogenesis from various precursors in isolated incubated hepatocytes. *Left*: glucose accumulation over 45-min incubation period in hepatocytes from control and trained rats in presence of saturating concentration of alanine (Ala; 20 mM) and lactate-pyruvate (La + Pyr; 20:2 mM). *Right*: mean glucose flux computed from linear accumulation of glucose between 15 and 45 min during incubation with various precursors, or without substrates (no subst.). Results are means \pm SE for $n = 9$ in each group. J_{glucose} , gluconeogenic flux; DHA, dihydroxyacetone; Glyc, glycerol. Statistical comparisons were made with Student's *t*-test for unpaired samples: * $P \leq 0.05$ and ** $P \leq 0.005$.

sion in the presence of aminooxyacetate. A marked accumulation of intracellular alanine was observed in both experimental groups, which was consistently higher in hepatocytes from trained compared with control rats throughout the 15-min incubation period. Maximal intracellular alanine accumulation was 45% higher in hepatocytes from trained rats (163 ± 9 vs. $112 \pm 5 \mu\text{mol/g dry cells}$). Figure 2, *right*, shows the plot of $\text{time}/[\text{alanine}]_{\text{intra}}$ against $1/\text{time}$: the *x*-intercept is the time to half-maximal alanine accumulation ($t_{1/2}$), whereas the ratio *x*-intercept to *y*-intercept is the maximal alanine accumulation (14). The largest maximal alanine accumulation observed in hepatocytes from trained rats was associated with no difference in $t_{1/2}$ (1.33 ± 0.03 vs. 1.32 ± 0.04 min in trained and control groups, respectively).

Effect of training on gluconeogenesis from alanine in perfused hepatocytes. In the absence of alanine, the respiration rate (VO_2) of the cell suspension, stimulated by 0.2 mM oleate, was significantly 15.5% higher in hepatocytes from trained vs. control rats (11.9 ± 0.5 vs. $10.3 \pm 0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{g dry cells}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; Fig. 3). With increasing alanine concentration, the increase in VO_2 was slightly lower in hepatocytes from trained vs. control rats. However, over the entire range of alanine concentration, the average VO_2 remained significantly ~8% higher in hepatocytes from trained rats (average

VO_2 over the experiment: 14.3 ± 0.4 vs. $13.2 \pm 0.4 \mu\text{mol}\cdot\text{g dry cells}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ in control rats).

Figure 4 shows J_{glucose} (flow rate in the chamber \times glucose concentration in the perfusate) vs. alanine concentration in the medium during perfusion in hepatocytes from trained and control rats. As already observed in the incubation experiments, perfused hepatocytes from trained rats exhibited a higher maximal gluconeogenic flux compared with that of control rats: 1.80 ± 0.03 vs. $1.19 \pm 0.06 \mu\text{mol}\cdot\text{g dry cells}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ at the highest alanine concentration (9.6 mM). The higher J_{glucose} in hepatocytes from trained rats was not only observed at saturating alanine concentrations but also for subsaturating concentrations as low as 0.6 mM.

The relationships between the concentrations of selected intermediates, on one hand, and J_{glucose} , on the other hand, in hepatocytes isolated from trained and control rats, when perfused with increasing concentration of alanine, are shown in Figure 5. The relationship found between cytosolic 3-phosphoglycerate (Fig. 5, *top left*), phosphoenolpyruvate (Fig. 5, *top right*), and pyruvate (Fig. 5, *bottom left*), on one hand, and J_{glucose} on the other hand, were similar in hepatocytes from trained and control rats, i.e., a single relationship between J_{glucose} and the concentration of the given intermediate was observed. In addition, over the range of concentrations of intermediates observed in the present experi-

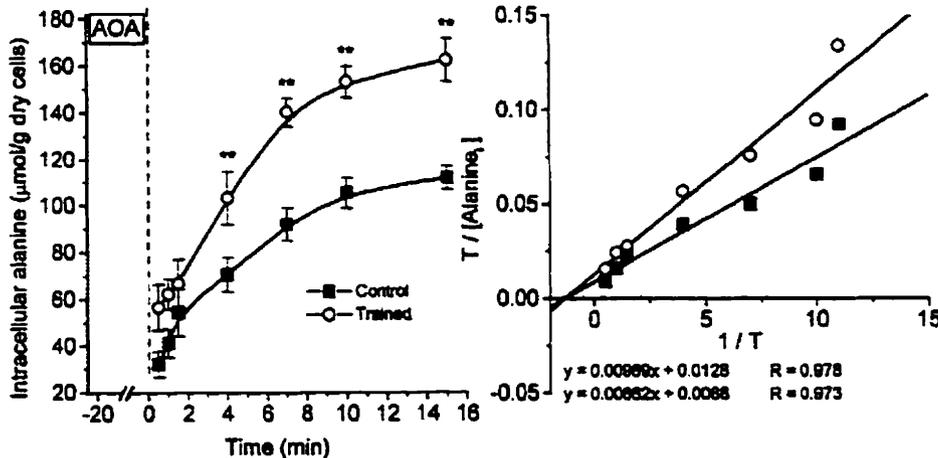


Fig. 2. Effect of training on alanine transport capacity measured in incubated isolated hepatocytes in presence of aminooxyacetate (AOA). *Left*: intracellular alanine accumulation ($[\text{alanine}]_{\text{intra}}$) over 15-min incubation period. *Right*: Hanes plot of $\text{time}/[\text{alanine}]_{\text{intra}}$ against $1/\text{time}$. Time to half-maximal accumulation ($1/T$) = *x*-intercept. Maximal accumulation = *x*-intercept/*y*-intercept. Results are means \pm SE for $n = 6$ in each group. Statistical comparisons were made with Student's *t*-test for unpaired samples: ** $P \leq 0.005$.

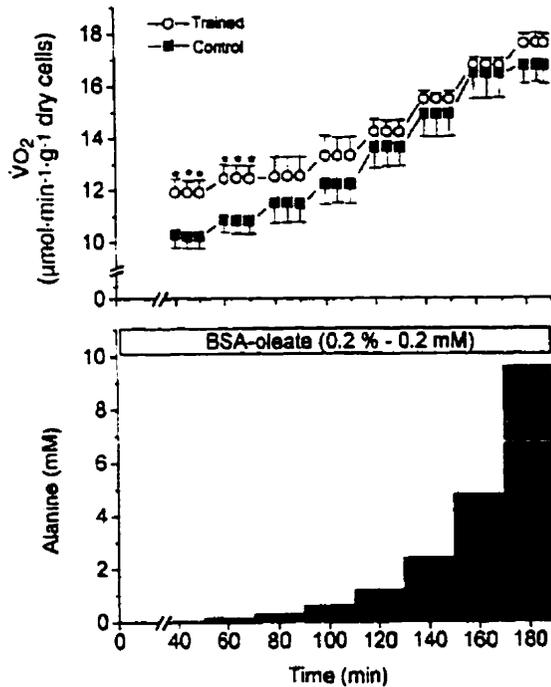


Fig. 3. Oxygen consumption (VO_2) of hepatocytes from control and trained rats at each steady-state (*top*) during perfusion with alanine at increasing concentrations (*bottom*). Results are means \pm SE for $n = 5$ in both groups. Two-way ANOVA with repeated measurements on 1 factor showed that VO_2 was significantly higher in hepatocytes from trained rats ($*P \leq 0.05$).

ment, these relationships did not reach a plateau. In contrast, when J_{glucose} was plotted against intracellular alanine concentration, the relationships were markedly different for hepatocytes isolated from trained and control rats and both reached a plateau (Fig. 5, *bottom right*). For intracellular alanine concentration higher than $\sim 1 \mu\text{mol/g}$ dry cells (corresponding to 1.2 mM in the medium; Fig. 6, *top*), J_{glucose} was markedly and

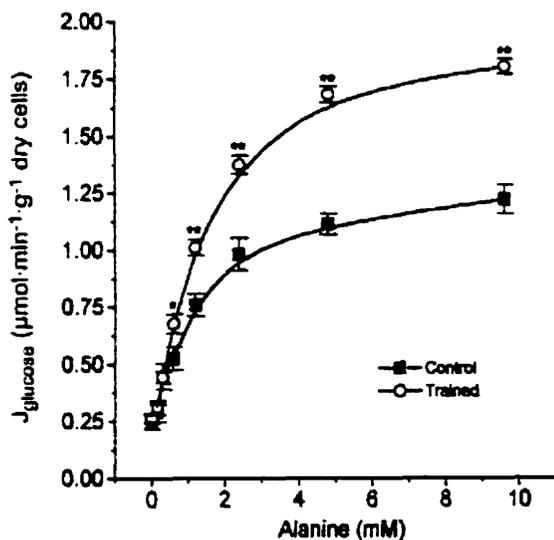


Fig. 4. Effect of training on gluconeogenesis from alanine in perfused hepatocytes. Results are means \pm SE for $n = 5$ in each group. Statistical comparisons were made with Student's t -test for unpaired samples. $*P \leq 0.05$ and $**P \leq 0.005$.

significantly higher in hepatocytes from trained rats. Below this value, the two relationships could not be distinguished.

As shown on Fig. 6, *top*, intracellular alanine concentration increased linearly from ~ 0.2 to $\sim 6.5 \mu\text{mol/g}$ when alanine concentration in the medium was increased from 0 to 9.6 mM. Compared with hepatocytes from control rats, intracellular alanine concentration was slightly, but not significantly, lower in hepatocytes from trained rats. Figure 6, *bottom*, shows the relationship between pyruvate and intracellular alanine concentration. A saturation kinetic was observed in hepatocytes from both experimental groups. However, for a given intracellular alanine concentration, pyruvate concentration was higher in hepatocytes from trained compared with control rats.

Table 1 shows the ratio of NADH to NAD^+ in the cytosol and mitochondria computed, respectively, from the ratios of lactate to pyruvate and β -hydroxybutyrate to acetoacetate in the perfusate (40). These ratios were stable over time during the perfusion, and the data have been pooled. The ratios of NADH to NAD^+ were significantly lower in hepatocytes from trained vs. control rats, both in the cytosol and mitochondria. The ratio of mitochondrial to cytosolic NADH/ NAD^+ was, however, two times higher in hepatocytes from trained vs. control rats.

DISCUSSION

Results from the incubation experiments with saturating substrate concentration show that training significantly increases gluconeogenic capacity from alanine (+64%), glycerol (+21%), lactate-pyruvate (+18%), and DHA (+10%). Apparently, no data are available in the literature concerning the effect of training on gluconeogenic flux from glycerol. In contrast, results obtained with alanine, DHA, and lactate-pyruvate are in accordance with previous reports on the effect of training on gluconeogenic capacity (31, 33, 34). Sumida and Donovan (33) found that in liver perfused in situ, glucose production from [^{14}C]alanine in saturating concentration (10 mM) was significantly increased by 28% after training. They also reported an $\sim 12\%$ increase in glucose production from 20 mM DHA, although this result did not reach statistical significance. As for lactate-pyruvate, Sumida et al. (34) have reported that maximal glucose flux from [^{14}C]lactate was 23% higher in perfused liver from trained rats. The much larger increases reported by Podolin et al. (31) in liver slices from middle-aged and old rats incubated with [^{14}C]lactate (100–200%) could be due to the fact that the liver slices were incubated with glucagon and epinephrine. Indeed, training not only increases basal gluconeogenic flux but also its response to various hormonal factors such as norepinephrine (31) and glucagon (12, 13).

Lactate and alanine both enter the gluconeogenic pathway at the level of pyruvate, and Sumida and Donovan (33) observed a similar 23–28% increase in J_{glucose} from these two substrates after training. These authors, thus, hypothesized that these results could reflect a common training adaptation for both sub-

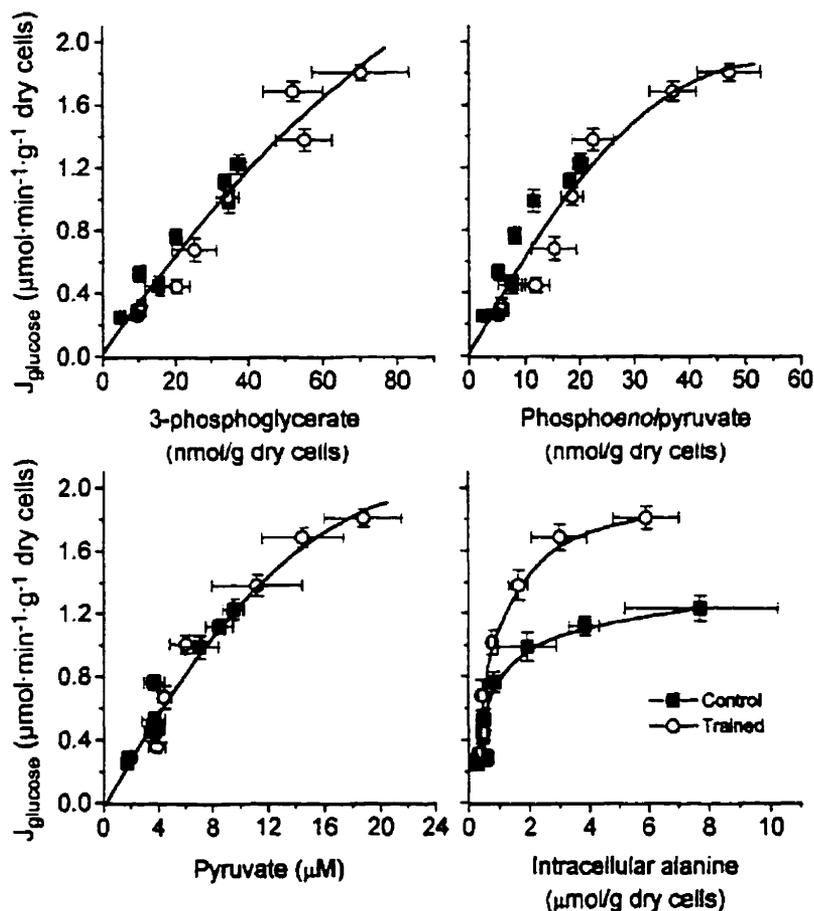


Fig. 5. Relationship between gluconeogenic flux and concentrations of selected intermediates in perfused hepatocytes from trained and control rats: cytosolic 3-phosphoglycerate (*top left*) and phosphoenolpyruvate (*top right*) and pyruvate in perfusate (*bottom left*) and intracellular alanine (*bottom right*). Results are means \pm SE for $n = 5$ in each group.

strates at the level of the phosphoenolpyruvate-pyruvate cycle, favoring pyruvate phosphorylation. However, they did not exclude the possibility that the results for lactate and alanine arose from specific adaptations for each substrate. Indeed, the observation made in the present study, that training increases the gluconeogenic capacity from various precursors that enter gluconeogenesis at very different levels, suggests that the adaptation of this pathway to exercise training probably does not occur at a single step but could be, at least partly, different for each precursor. The purpose of the present study was to try to identify those adaptations responsible for the increased gluconeogenic flux from alanine. This increase was not only the largest observed in the incubation experiment at saturating alanine concentration, but it was also observed in the perfusion experiment from subsaturating alanine concentrations as low as 0.6 mM (Fig. 4), which is only slightly higher than the range of concentration observed at rest and during exercise (0.2–0.5 mM; Refs. 1, 16).

As suggested by Sumida and Donovan (33), the increase in J_{glucose} from lactate-pyruvate after training points to an adaptation at the level of the phosphoenolpyruvate-pyruvate cycle, which has a flux control coefficient for gluconeogenesis of $\sim 60\%$ with lactate-pyruvate as precursors (18, 32). Accordingly, an increase in gluconeogenesis from lactate-pyruvate could be due to an increase in the activity of pyruvate carboxylase (PC)

and/or of phosphoenolpyruvate-carboxykinase (PEPCK) or to a reduction in the activity of pyruvate kinase (PK). As for the effect of training on PK activity, no data appear to be available. Results from the present experiment with DHA as precursor, however, suggest that training does not reduce PK activity. Indeed, when DHA is provided to isolated hepatocytes, a portion enters the glycolytic pathway and the lactate-pyruvate flux reflects the activity of PK (3). In the present study, lactate-pyruvate concentrations in the medium were slightly, albeit not significantly, higher when hepatocytes from trained rats were incubated with DHA (26.2 ± 4.6 vs. 20.8 ± 2.4 $\mu\text{mol/g}$ dry cells after 45 min of incubation). These figures underestimate the flux through PK because in incubation experiments a portion of the lactate-pyruvate produced is converted into glucose. This underestimation could be larger with hepatocytes from trained rats, because gluconeogenesis from lactate-pyruvate was increased after training. Taken together, these results therefore suggest that the putative training adaptation at the level of the phosphoenolpyruvate-pyruvate cycle is due to the activation of PC and/or PEPCK, rather than to an inhibition of PK.

The effect of training on PEPCK and PC has been assessed in several studies (19, 20, 34, 41). However, no change in the maximal activity of PEPCK (19, 20, 34, 41) and PC (19, 20) and in PEPCK mRNA content (19) was reported after training. Although the activity of

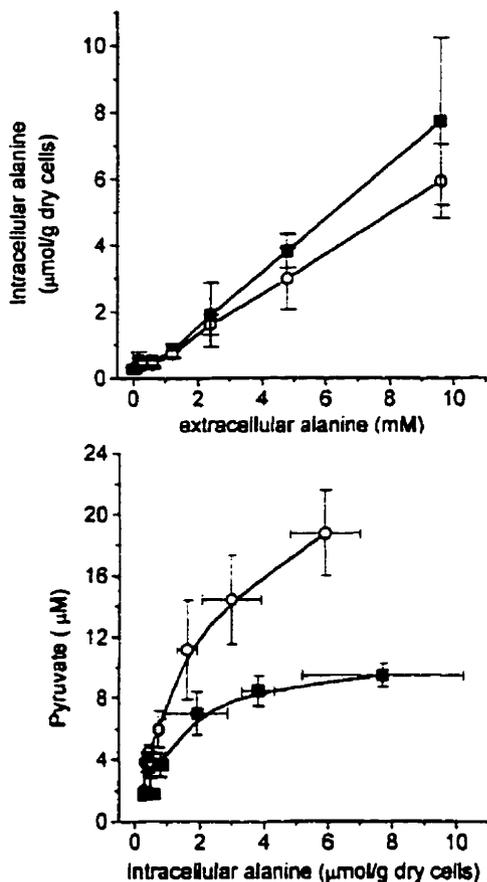


Fig. 6. Effect of training on alanine transport and transamination in perfused hepatocytes. Relationships between intra- and extracellular alanine concentration (*top*) and between pyruvate and intracellular alanine concentration (*bottom*) during perfusion in hepatocytes from control and trained rats. Results are means \pm SE for $n = 5$ in each group.

PEPCK is entirely controlled by the rate of transcription and the concentration of this enzyme (30), these findings remain compatible with the consistent observation of a higher gluconeogenic flux from lactate-pyruvate observed after training by Sumida et al. (34).

Table 1. Mitochondrial and cytosolic NADH/NAD⁺ in hepatocytes from control and trained rats during perfusion with alanine and ratio between mitochondrial and cytosolic redox states

	Cytosol		Mitochondria		Mito/ Cyto
	L/P	NADH/ NAD ⁺	β -OH/ AA	NADH/ NAD ⁺	
Control	4.61 \pm 0.84	5.12 \pm 0.93	0.85 \pm 0.10	421 \pm 52	82 \pm 11
Trained	1.52 \pm 0.17*	1.68 \pm 0.22*	0.57 \pm 0.06*	283 \pm 28*	168 \pm 27*

Values are means \pm SE of pooled data ($n = 40$) in hepatocytes from control and trained rats. Cytosolic and mitochondrial NADH/NAD⁺, respectively, were computed from lactate-to-pyruvate (L/P) and β -hydroxybutyrate-to-acetoacetate (β -OH/AA) ratios, with equilibrium constant of lactate dehydrogenase (1.11×10^{-4}) and β -hydroxybutyrate dehydrogenase (4.93×10^{-2}) (36). Measurements were made at each steady state during perfusion and remained stable throughout the experiments. Mito/Cyto. ratio between mitochondrial and cytosolic redox states. Statistical comparisons were made with Student's *t*-test for unpaired samples. * $P \leq 0.05$.

Sumida and Donovan (33), and Podolin et al. (31), as well as in the present experiment. Indeed, the gluconeogenic flux across the phosphoenolpyruvate-pyruvate cycle not only depends on the activity of the enzymes controlling this cycle but also on the actual concentration of the substrates for the various enzymes in the condition studied. In this respect, it could be hypothesized that training increases the supply of oxaloacetate to PEPCK, which, in turn, increases the gluconeogenic flux without any change in the concentration and/or activity of the enzymes involved in the phosphoenolpyruvate-pyruvate cycle. No data are currently available on the effect of training on oxaloacetate transport across the mitochondrial membrane, and/or its concentration in the cytosol when lactate-pyruvate is provided to the hepatocyte, to support this hypothesis. In contrast, as discussed below, results from the present experiment rule out this hypothesis when alanine is the gluconeogenic precursor.

In fact, results from the perfusion experiment, which closely mimics the behavior of the hepatocyte *in vivo*, indicate that putative adaptations at the level of the phosphoenolpyruvate-pyruvate cycle, and/or downstream of this cycle, are not involved in the increased gluconeogenic flux from alanine. This is indicated by the observation that the relationship between pyruvate concentration and J_{glucose} was similar for hepatocytes from trained and control rats (Fig. 5, *bottom left*). This single relationship indicates that for a given pyruvate concentration, J_{glucose} is not modified by training. The observed increase in J_{glucose} from alanine is solely due to the increased pyruvate concentration and does not depend on possible adaptations at the level of the phosphoenolpyruvate-pyruvate cycle. A single relationship was also found between cytosolic phosphoenolpyruvate and 3-phosphoglycerate concentrations, on one hand, and J_{glucose} , on the other hand (Fig. 5, *top*). These observations further suggest that the increased J_{glucose} from alanine after training is not due to adaptations at steps located downstream from pyruvate. Alternatively, it cannot be ruled out that training adaptations occur between pyruvate and glucose in the gluconeogenic and glycolytic pathways but that these adaptations cancel each other so that no net effect on the gluconeogenic flux is observed.

These findings are in agreement with several consistent data showing that alanine metabolism in the liver is controlled upstream of pyruvate, by its transport into the hepatocyte for low extracellular concentrations (< 1 mM; Refs. 14, 17, 27) and by its transamination into pyruvate at higher concentrations (8, 26). Indeed, the detailed quantitative analysis made by Groen et al. (17) shows that the flux control coefficient of alanine transport for gluconeogenesis was between 85 and 100% for alanine concentration below 1 mM and decreased to $\sim 50\%$ for concentrations ranging between 1.5 and 3.0 mM and to only $\sim 20\%$ at 6 mM alanine. Malette et al. (26) showed that increasing alanine concentration from 0.45 to 16 mM in perfused liver was associated with an increase in intracellular alanine concentration without any further changes in pyruvate concentration and

J_{glucose} (as observed in the present study: see Fig. 6, *bottom*). In perfused hepatocytes, Boon and Meijer (8) also found that at high alanine concentration (5 mM), alanine aminotransferase had a low elasticity coefficient and was therefore responsible for the control of the metabolic flux.

It can thus be hypothesized that the training-induced increase in gluconeogenic flux observed in the present experiment at high alanine concentration (1.2–9.6 mM) is entirely due to an increased transamination, which has a high flux control coefficient for gluconeogenesis in these conditions (8, 26). Data from the perfusion experiment confirm that at high alanine concentration the transamination step controls the gluconeogenic flux from alanine. This is evidenced by the linear increase in intracellular alanine concentration, without any trend to plateau, over the entire range of extracellular alanine concentration (Fig. 6, *top*). In contrast, the relationships between intracellular alanine concentration and J_{glucose} , both of which plateaued for alanine concentration in the medium higher than ~4 mM, and the plateau reached were markedly higher in hepatocytes from trained vs. control rats (1.80 ± 0.03 vs. 1.19 ± 0.06 $\mu\text{mol} \cdot \text{g dry cells}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). A similar observation was made for the relationships between intracellular alanine concentration and pyruvate (maximal pyruvate concentration: 18 vs. 9 μM in the perfusate from hepatocytes from control and trained rats), although the plateau was not reached in hepatocytes from trained rats (Fig. 6, *bottom*). Taken together, these observations confirm that at high alanine concentrations, transamination is the main step controlling the gluconeogenic flux from alanine and indicate that training increases this flux by increasing the capacity of the hepatocyte to convert alanine into pyruvate.

In contrast, the observed increase in J_{glucose} at low alanine concentration in the medium (0.6 and 1.2 mM) could be mainly due to an increased alanine transport capacity. Data from several in vitro experiments, indeed, indicate that alanine transport into the hepatocyte has a high flux control coefficient for gluconeogenesis in these conditions (14, 17, 27). Data from Wasserman et al. (38) also show that in response to exercise in dogs, the increase in alanine conversion into glucose parallels the increase in its uptake across the liver. In the present experiment, during perfusion at low alanine concentration (<1.2 mM), the relationship between intracellular alanine concentration (<0.8 $\mu\text{mol/g dry cells}$) and J_{glucose} in hepatocytes from trained rats cannot be distinguished from that in hepatocytes from control rats. This observation suggests that, in these conditions, the increased capacity for alanine transamination brought about by training is not responsible for the increase in J_{glucose} . The larger gluconeogenic flux observed (Fig. 4) could rather be due to the marked increase in alanine transport capacity across the plasma membrane, which is clearly demonstrated in incubated hepatocytes in the presence of aminoxyacetate as a transaminase inhibitor (Fig. 2).

The capacity of alanine aminotransferase ($60 \mu\text{mol} \cdot \text{g dry wt}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; Ref. 33) is much higher than that

of alanine transport in the liver ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{g dry wt}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; Ref. 23). In addition, data concerning the effect of training on alanine aminotransferase activity are both limited and conflicting (21, 33). Alanine transamination could, however, control gluconeogenesis if 2-oxoglutarate supply in the cytosol becomes insufficient (8). The supply of cytosolic 2-oxoglutarate depends on the activity of the malate-aspartate shuttle, which, in turn, depends on the rate of mitochondrial respiration (i.e., VO_2) and on the inner mitochondrial membrane potential ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$; Ref. 29). In the present experiment, VO_2 was consistently higher in hepatocytes from trained vs. control rats (Fig. 3). This observation was already made by Bobyleva-Guarriero and Lardy (7) and is consistent with the reported higher malate dehydrogenase activity reported by Ji et al. (21) in livers from trained rats. As for $\Delta\mu_{\text{H}^+}$, the ratio between the mitochondrial and cytosolic redox states [$(\text{NADH}/\text{NAD}^+_{\text{mito}})/(\text{NADH}/\text{NAD}^+_{\text{cyto}})$] in the perfusion experiment also suggests that it was significantly higher in livers from trained rats. Indeed, the large difference between the redox states in the mitochondria and the cytosol depends on the activity of the glutamate-aspartate carrier of the malate aspartate shuttle, which is driven by $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ (24). In hepatocytes from trained rats, the segregation of reducing equivalents in the mitochondria vs. the cytosol was two times higher than in hepatocytes from control rats (Table 1), strongly indicating that $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ was also higher. It is therefore tempting to speculate that the observed increase in alanine transamination into pyruvate could be due to an increased mitochondrial respiration in hepatocytes from trained vs. control rats. The associated stimulation of the malate-aspartate shuttle could, in turn, increase the supply of cytosolic 2-oxoglutarate, thus promoting alanine transamination into pyruvate and gluconeogenesis. In addition, the increase in mitochondrial respiration could also explain the increased J_{glucose} from glycerol observed in incubated hepatocytes from trained rats. It is, indeed, well established that an increased J_{glucose} from glycerol is entirely dependent on the rate of removal of cytosolic reducing equivalents (6, 25, 39).

In conclusion, results from the present experiment confirm that gluconeogenesis from alanine is increased in isolated hepatocytes from trained vs. control rats, both at low (near physiological) and high (saturating) concentrations. This increase is not due to adaptations at the level of the phosphoenolpyruvate-pyruvate cycle or at steps located downstream from this cycle. It is rather due to an increased alanine transport capacity at low alanine concentration and to an increased transamination of alanine into pyruvate at high alanine concentration. This later phenomenon could, in turn, be due to the increased mitochondrial respiration observed in hepatocytes from trained vs. control rats, which activates the malate-aspartate shuttle and increases the supply of cytosolic 2-oxoglutarate.

This study was supported by grants from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada and from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec

(FCAR). Y. Burelle is a recipient of a PhD fellowship from the Fonds FCAR-Fonds de Recherche en Santé du Québec.

Address for reprint requests and other correspondence: F. Péronnet, Département de Kinésiologie, Université de Montréal, CP 6128 Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7 (E-mail: Francois.Peronnet@Umontreal.ca).

Received 9 April 1999; accepted in final form 2 September 1999.

REFERENCES

- Ahlborg, G., P. Felig, L. Hagenfeldt, R. Hendler, and J. Wahren. Substrate turnover during prolonged exercise in man. Splanchnic and leg metabolism of glucose, free fatty acids, and amino acids. *J. Clin. Invest.* 53: 1080-1090, 1974.
- Argaud, D., S. Halimi, F. Castelloni, and X. M. Leverve. Inhibition of gluconeogenesis in isolated hepatocytes after chronic treatment with phenobarbital. *Biochem. J.* 280: 663-669, 1991.
- Argaud, D., H. Roth, N. Wiernsperger, and X. M. Leverve. Metformin decreases gluconeogenesis by enhancing the pyruvate kinase flux in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 213: 1341-1348, 1993.
- Bergmeyer, H. U. *Methods of Enzymatic Analysis* (3rd ed.). New York: Academic, 1974.
- Berry, M. N., and D. S. Friend. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell. Biol.* 43: 506-520, 1969.
- Berry, M. N., E. Kun, and H. V. Werner. Regulatory role of reducing-equivalent transfer from substrate to oxygen in the hepatic metabolism of glycerol and sorbitol. *Eur. J. Biochem.* 33: 407-414, 1973.
- Bobyleva-Guarriero, V., and H. A. Lardy. The role of malate in exercise-induced enhancement of mitochondrial respiration. *Arch. Biochem. Biophys.* 245: 470-476, 1986.
- Boon, L., and A. J. Meijer. Role of amino-acid transport across the plasma membrane in the control of metabolic pathways in hepatocytes. In: *Molecular Mechanisms of Transport*, edited by E. Quagliariello and F. Palmieri. Amsterdam: Elsevier, 1992, p. 283-290.
- Coggan, A. R., W. M. Kohrt, R. J. Spina, D. M. Bier, and J. O. Holloszy. Endurance training decreases plasma glucose turnover and oxidation during moderate-intensity exercise in men. *J. Appl. Physiol.* 68: 990-996, 1990.
- Donovan, C. M., and K. D. Sumida. Training enhanced hepatic gluconeogenesis: the importance for glucose homeostasis during exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 29: 628-634, 1997.
- Donovan, C. M., and K. D. Sumida. Training improves glucose homeostasis in rats during exercise via glucose production. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 258: R770-R776, 1990.
- Drouin, R., C. Lavoie, J. Bourque, F. Ducros, D. Poisson, and J.-L. Chiasson. Increased hepatic glucose production response to glucagon in trained subjects. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 274: E23-E28, 1998.
- Drouin, R., M. Milot, F. Péronnet, D. Massicotte, and C. Lavoie. Glucagon effect on hepatic glycogenolysis after training (Abstract). *Can. J. Appl. Physiol.* 23: 477, 1998.
- Fafournoux, P., C. Rémésy, and C. Demigné. Control of alanine metabolism in rat liver by transport processes or cellular metabolism. *Biochem. J.* 210: 645-652, 1983.
- Fell, D. *Understanding the Control of Metabolism*, edited by K. Snell. London: Portland, 1997, p. 301.
- Felig, P., and J. Wahren. Amino acid metabolism in exercising man. *J. Clin. Invest.* 50: 2703-2714, 1971.
- Groen, A. K., H. J. Sips, R. C. Vervoorn, and J. M. Tager. Intracellular compartmentation and control of alanine metabolism in rat liver parenchymal cells. *Eur. J. Biochem.* 122: 87-93, 1982.
- Groen, A. K., C. W. van Roermund, R. C. Vervoorn, and J. M. Tager. Control of gluconeogenesis in rat liver cells. Flux control coefficients of the enzymes in the gluconeogenic pathway in the absence and presence of glucagon. *Biochem. J.* 237: 379-389, 1986.
- Horn, D. B., D. A. Podolin, J. E. Friedman, D. A. Scholnick, and R. S. Mazzeo. Alterations in key gluconeogenic regulators with age and endurance training. *Metabolism* 46: 414-419, 1997.
- Huston, R. L., P. C. Weiser, G. L. Dohm, E. W. Askew, and J. B. Boyd. Effects of training, exercise and diet on muscle glycolysis and liver gluconeogenesis. *Life Sci.* 17: 369-376, 1975.
- Ji, L. L., D. L. Lennon, R. G. Kochan, F. J. Nagle, and H. A. Lardy. Enzymatic adaptation to physical training under beta-blockade in the rat. Evidence of a beta 2-adrenergic mechanism in skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 78: 771-778, 1986.
- Koivisto, V., R. Hendler, E. Nadel, and P. Felig. Influence of physical training on the fuel-hormone response to prolonged low intensity exercise. *Metabolism* 31: 192-197, 1982.
- Kristensen, L. O., L. Sestoft, and M. Folke. Concentrative uptake of alanine in hepatocytes from fed and fasted rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 244: G491-G500, 1983.
- Kunz, W. S., and E. J. Davis. Control of reversible intracellular transfer of reducing potential. *Arch. Biochem. Biophys.* 284: 40-46, 1991.
- Leverve, X. M., A. K. Groen, A. J. Verhoeven, and J. M. Tager. Kinetic analysis of short-term effects of alpha-agonists on gluconeogenesis in isolated hepatocytes. *FEBS Lett.* 181: 43-46, 1985.
- Malette, L. E., J. H. Exton, and C. R. Park. Effects of glucagon on amino acid transport and utilization in the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 244: 5724-5728, 1969.
- McGivan, J. D., J. C. Ramsell, and J. H. Lacey. Stimulation of alanine transport and metabolism by dibutyryl cyclic AMP in the hepatocytes from fed rats. Assessment of transport as a potential rate-limiting step for alanine metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 644: 295-304, 1981.
- Mendenhall, L. A., S. C. Swanson, D. L. Habash, and A. R. Coggan. Ten days of exercise training reduces glucose production and utilization during moderate-intensity exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 266: E136-E143, 1994.
- Nicholls, D. G. The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined by ion distribution. *Eur. J. Biochem.* 50: 305-314, 1974.
- Pilkis, S. J., and D. K. Granner. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 885-909, 1992.
- Podolin, D. A., T. T. Gleeson, and R. S. Mazzeo. Role of norepinephrine in hepatic gluconeogenesis: evidence of aging and training effects. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 267: E680-E686, 1994.
- Rigoulet, M., X. M. Leverve, P. J. A. Plomp, and A. J. Meijer. Stimulation by glucose of gluconeogenesis in hepatocytes isolated from starved rats. *Biochem. J.* 245: 661-668, 1987.
- Sumida, K. D., and C. M. Donovan. Enhanced hepatic gluconeogenic capacity for selected precursors after endurance training. *J. Appl. Physiol.* 79: 1883-1888, 1995.
- Sumida, K. D., J. H. Urdiales, and C. M. Donovan. Enhanced gluconeogenesis from lactate in perfused livers after endurance training. *J. Appl. Physiol.* 74: 782-787, 1993.
- Taguchi, S., Y. Hata, and K. Itoh. Enzymatic responses and adaptations to swimming training and hypobaric hypoxia in postnatal rats. *Jpn. J. Physiol.* 35: 1023-1032, 1985.
- Turcotte, L. P., and G. A. Brooks. Effects of training on glucose metabolism of gluconeogenesis inhibited short-term-fasted rats. *J. Appl. Physiol.* 68: 944-954, 1990.
- Van der Meer, R., and J. M. Tager. A simple method for the perfusion of isolated liver cells. *FEBS Lett.* 67: 36-40, 1976.
- Wasserman, D. H., P. E. Williams, D. B. Lacy, D. R. Green, and A. D. Cherrington. Importance of intrahepatic mechanisms to gluconeogenesis from alanine during exercise and recovery. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 254: E518-E525, 1988.
- Williamson, J. R., A. Jakob, and C. Refino. Control of the removal of reducing equivalents from the cytosol in perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 246: 7632-7641, 1971.
- Williamson, J. R., P. Lund, and H. A. Krebs. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem. J.* 103: 514-526, 1967.
- Winder, W. W. Regulation of hepatic glucose production during exercise. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 13: 1-31, 1985.
- Zuurendonk, P. F., and J. M. Tager. Rapid separation of particular components and soluble cytoplasm of isolated rat liver cells. *Biochim. Biophys. Acta* 333: 393-399, 1974.

CHAPITRE 3: DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans cette section, nous avons choisi de discuter de deux aspects qui n'ont pas été présentés dans la discussion des études expérimentales et qui, au terme de la thèse, nous semblent essentiels d'aborder. Le premier aspect est de nature méthodologique et concerne les limites inhérentes à la technique de traçage isotopique au ^{13}C utilisée dans les études un à trois. Le second aspect concerne plus particulièrement les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la capacité néoglucogénique induite par l'entraînement, thème abordé dans l'étude quatre.

.1 Études par traçage isotopique au ^{13}C : Considérations méthodologiques.

La méthode de traçage développée par notre laboratoire, qui est non-invasive et relativement simple, combine les avantages de la calorimétrie indirecte respiratoire corrigée pour l'oxydation des protéines et la sensibilité de la spectrométrie de masse isotopique. Cette technique nous permet de mesurer l'oxydation des substrats exogènes avec un enrichissement isotopique de cent à mille fois moins élevé que l'enrichissement isotopique requis pour les mêmes analyses effectuées par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS). Il s'agit d'une caractéristique avantageuse pour la mesure de l'oxydation de substrats exogènes, compte tenu de la masse importante de substrat à tracer et du coût élevé des traceurs isotopiques. De plus, étant donné les faibles enrichissements en ^{13}C requis, les problèmes de fractionnements isotopiques dans les voies métaboliques sont minimisés. Récemment, nous avons parfait cette approche par la mesure de l'enrichissement en ^{13}C du glucose plasmatique. Ceci permet d'avoir accès à des informations qualitatives additionnelles, de calculer l'oxydation du glucose circulant (glucose exogène + glucose hépatique), ainsi que l'oxydation du glycogène musculaire lorsque du ^{13}C -glucose est ingéré. Cependant, notre technique présente des limites méthodologiques qu'il est important de considérer dans l'interprétation des résultats obtenus.

.1.1 Enrichissement en ^{13}C du CO_2 expiré à la bouche

Lorsque du glucose ou des précurseurs néoglucogéniques (C_3 -substrats) marqués au ^{13}C sont ingérés, le $^{13}\text{CO}_2$ expiré à la bouche provient de trois sources (Figure 41). La

première source est l'oxydation directe du ^{13}C -glucose ou des $^{13}\text{C}_3$ -substrats par les tissus périphériques. Dans le cas où du glucose marqué est ingéré, cette production de $^{13}\text{CO}_2$ comprend également l'oxydation par les tissus périphériques du ^{13}C -lactate et de la ^{13}C -alanine marqué formés à partir du glucose exogène marqué [Brooks et Gaesser, 1980; Hetenyi et al., 1980; Mazzeo et al., 1986; Stanley et al. 1988]. La deuxième source de $^{13}\text{CO}_2$ est l'oxydation du glucose synthétisé par la néoglucogénèse à partir des $^{13}\text{C}_3$ -substrats ingérés, ou du lactate et de l'alanine marqués qui ont été produits en périphérie à partir du ^{13}C -glucose ingéré. Enfin, la troisième source de $^{13}\text{CO}_2$ est la perte de ^{13}C dans le CAC hépatique au cours de la néoglucogénèse [Katz et Chaikoff, 1955; Strisower et al., 1952; Weinman et al., 1957]. Dans nos études, la mesure de l'enrichissement isotopique du CO_2 expiré, lorsque des substrats exogènes marqués au ^{13}C sont ingérés, permet donc de déterminer le flux à travers l'ensemble de ces voies. Par contre, il est impossible de connaître avec précision la contribution de chacune d'elles à la production de $^{13}\text{CO}_2$.

Dans l'étude 3 portant sur l'oxydation d'une charge de glucose exogène ingérée chez des sujets sédentaires et entraînés, il y a peu de doute quant à la principale voie métabolique impliquée dans la production de $^{13}\text{CO}_2$, lors des expériences effectuées à l'exercice. En effet, compte tenu de ses besoins énergétiques par rapport à celui des autres tissus, le muscle squelettique est sans doute le principal consommateur de glucose circulant à l'exercice et il est responsable de la majeure partie de la production systémique de CO_2 . Dans cette situation, la production de $^{13}\text{CO}_2$ à la bouche reflète donc principalement l'oxydation directe du glucose exogène par les muscles au travail, ou bien indirecte en ayant préalablement transité par le pool de lactate [Brooks et Gaesser, 1980; Mazzeo et al., 1986; Stanley et al., 1988] et d'alanine [Hetenyi et al., 1980].

Dans la même étude, l'oxydation du glucose exogène a été mesurée au repos. Nous avons trouvé dans cette situation que les sujets entraînés avaient une capacité accrue à oxyder du glucose exogène. Ceci a principalement été attribué au fait que chez les sujets entraînés, les tissus périphériques captaient et oxydaient plus de glucose exogène. Cette explication est en accord avec l'observation qui a été faite dans plusieurs

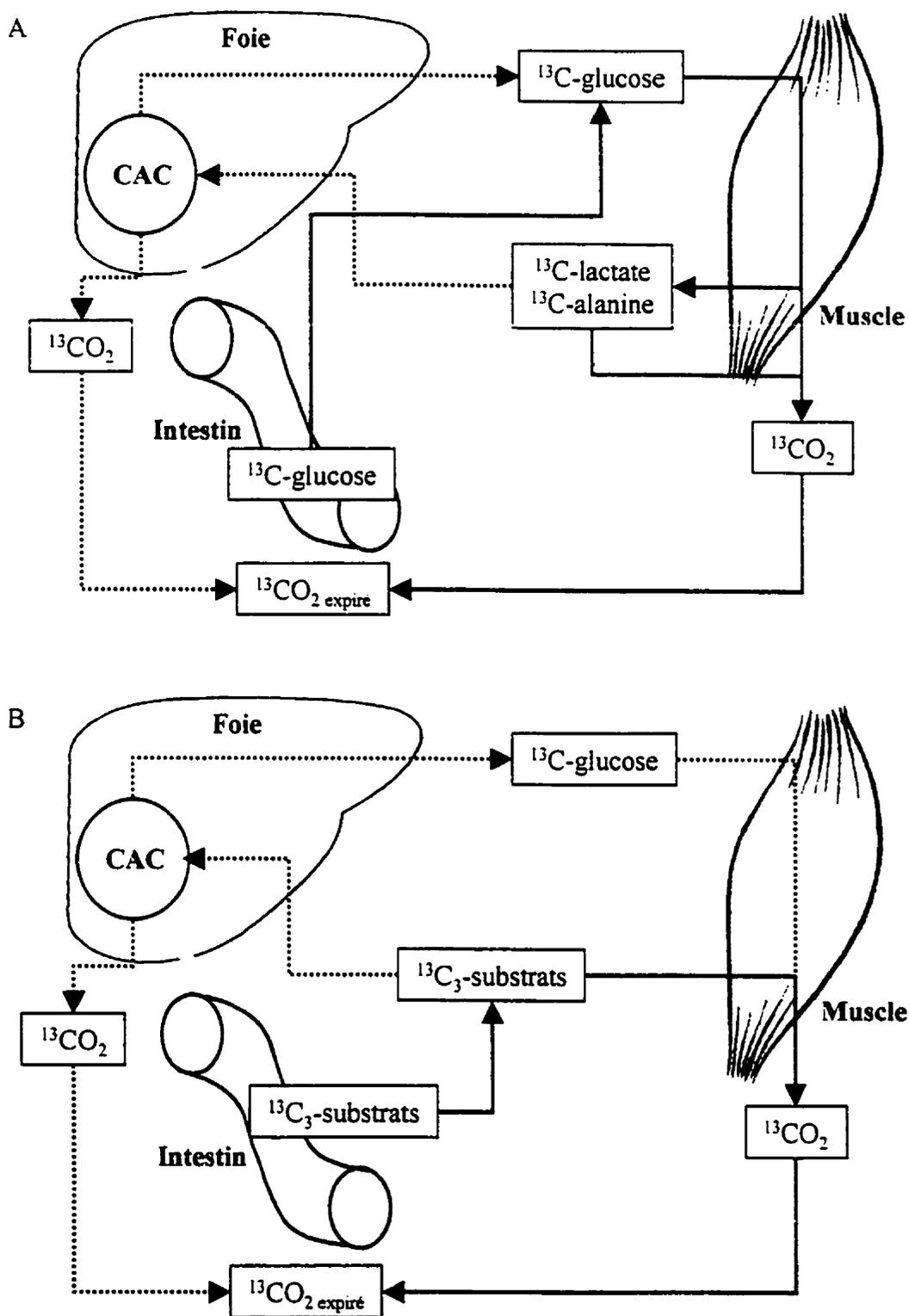


Figure 41: Principales voies métaboliques menant à la formation de $^{13}\text{CO}_2$ à la bouche lorsque du glucose (A) et des précurseurs néoglucogéniques marqués au ^{13}C (B) sont ingérés au repos et à l'exercice.

études [Dela et al., 1996] y compris la nôtre, que la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline sont meilleures chez les sujets entraînés. Cependant, il est important de considérer qu'au repos, la production de $^{13}\text{CO}_2$ à la bouche n'est probablement pas un aussi bon reflet de l'oxydation du glucose exogène par les tissus périphériques qu'elle ne l'est à l'exercice.

À titre d'exemple, Bergman et al. [2000] ont récemment montré que l'entraînement était associé à un accroissement du flux néoglucogénique à partir du lactate au repos. Il serait donc théoriquement possible que dans notre étude, la plus grande production de $^{13}\text{CO}_2$ observée chez les sujets entraînés au repos, soit en partie due à une plus grande perte de ^{13}C au niveau du CAC hépatique au cours de la néoglucogénèse à partir de précurseurs, qui sont formés en périphérie à partir du ^{13}C -glucose. Cependant, nous doutons que ceci puisse expliquer la différence d'environ 30 % observée au niveau du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du CO_2 expiré entre les sujets sédentaires et entraînés. La principale raison est que l'enrichissement du $^{13}\text{CO}_2$ produit dans la néoglucogénèse hépatique est probablement faible et qu'il contribue peu à l'enrichissement en ^{13}C du CO_2 expiré au repos. En effet, comme cela a été mentionné dans la revue de la littérature (section 2.1.3), le ^{13}C -lactate et alanine produits à partir du glucose exogène marqué dans les tissus périphériques, sont dilués de façon importante par du lactate et de l'alanine non marqués provenant d'autres sources [Diraison et al., 1998; Large et al., 1995]. De plus, le ^{13}C issu du lactate et de l'alanine marqués est dilué par le ^{12}C de l'acétyl-CoA dans le CAC hépatique [Hetenyi, 1982; Katz, 1985]. Finalement, l'ingestion de quantités importantes de glucose étalée sur une période de 120 minutes inhibe la production hépatique de glucose [McConnell et al., 1994] et donc probablement la néoglucogénèse.

Dans les études 1 et 2, où l'oxydation de précurseurs néoglucogéniques a été mesurée à l'exercice, l'impossibilité de déterminer la provenance du $^{13}\text{CO}_2$ expiré à la bouche est également importante à considérer dans l'interprétation des résultats. Dans ces études, nous avons tenté d'identifier quelles étaient les principales voies d'oxydation des précurseurs glucoformateurs ingérés, en comparant l'enrichissement en ^{13}C du

glucose circulant et celui du CO₂ expiré. Dans les études de notre laboratoire où l'oxydation du glucose circulant a été mesurée [Rhéaume et al., 1998; Chapitre 2, Étude 3], nous avons généralement observé une dilution de l'enrichissement en ¹³C de l'ordre de 15 à 20 ‰ δ ¹³C PDB.₁ entre le glucose circulant et le CO₂ expiré. Or, dans les expériences où du lactate (Études 1 et 2) et de l'alanine (Étude 2) marqués ont été ingérés, l'enrichissement en ¹³C du CO₂ expiré est demeuré pratiquement égal ou supérieur à l'enrichissement en ¹³C du glucose circulant. Ceci nous a amené à conclure qu'une fraction importante du ¹³CO₂ expiré à la bouche ne provenait pas de l'oxydation du ¹³C-glucose circulant, mais plutôt de l'oxydation directe du lactate et de l'alanine marqués dans les tissus périphériques (supposée dans les muscles au travail), sans conversion préalable en glucose au niveau du foie.

Même si cette interprétation des résultats est compatible avec un certain nombre de données provenant d'études sur le devenir métabolique du lactate et de l'alanine (voir discussion des études 1 et 2), il n'en demeure pas moins qu'elle est basée sur l'hypothèse que tout le ¹³CO₂ expiré à la bouche provient des tissus périphériques. Or, il est fort probable qu'une fraction du ¹³CO₂ expiré provienne des échanges isotopiques dans le CAC hépatique au cours de la conversion du lactate et de l'alanine en glucose. Il est donc possible que dans les études 1 et 2 nous ayons surestimé l'importance de l'oxydation directe du lactate et de l'alanine dans les tissus périphériques.

Cependant, il y a des raisons de croire que l'importance de cette surestimation est mineure. La première raison est que la production de CO₂ par le foie ne constitue qu'un faible pourcentage de la production systémique de CO₂ à l'exercice. En effet, en se basant sur la consommation d'oxygène hépatique à l'exercice, mesurée par différences artério-veineuse (environ 100 mL d'O₂ /min) [Ahlborg et al., 1974; Ahlborg et Bjorkman, 1990; Felig et Wahren, 1971] et, compte tenu que cet organe oxyde principalement des acides-gras, il est possible d'estimer que la production totale de CO₂ par le foie est d'environ 75 mL/min. Cette production de CO₂ représente seulement 2 à 3 % de la production totale de CO₂ observée au cours de l'exercice dans nos deux études (2,5 et 3,0 L/min respectivement). La deuxième raison est que le muscle squelettique,

qui est responsable de la majeure partie de la production de CO₂, possède les transporteurs permettant de capter le lactate [Pilegaard et al., 1994; Roth, 1991] et l'alanine [Christensen, 1990; Rennie et al., 1995; Shotwell et al., 1983] ainsi que l'équipement enzymatique pour les oxyder. Il nous apparaît donc raisonnable de croire que ces deux substrats ont été en majorité utilisés dans le muscle à l'exercice ayant un flux oxydatif le justifiant.

.1.2 Enrichissement en ¹³C du glucose circulant et calcul de l'oxydation du glucose hépatique

Dans les études 1 et 2, l'enrichissement en ¹³C du glucose circulant a été mesuré lorsque du ¹³C-lactate ou de la ¹³C-alanine était ingéré, dans le but de déterminer si une part importante de ces précurseurs exogènes était convertie en glucose par le foie, avant d'être oxydée par les tissus périphériques au cours de l'exercice prolongé. Cependant, nous n'avons pu utiliser directement cette mesure pour déterminer la quantité de lactate et d'alanine exogène convertie en glucose avant d'être oxydé. En effet, il est admis que l'enrichissement en ¹³C du glucose circulant ne constitue qu'un index grossier de l'activité de la néoglucogénèse pour deux raisons. La première raison est que l'enrichissement isotopique réel du lactate, de l'alanine et du pyruvate entrant dans la voie de la néoglucogénèse est inconnu à cause de phénomènes de dilution par des précurseurs endogènes [Diraison et al., 1998; Large et al., 1995]. La seconde raison est qu'une dilution isotopique survient également au cours des échanges de carbones dans le pool d'oxaloacétate mitochondrial, qui est le point de croisement de la voie de la néoglucogénèse et du CAC [Hetenyi, 1982; Katz, 1985]. Finalement, dans nos deux études, plus particulièrement dans l'étude 1 en raison de la grande quantité de glucose exogène ingéré, l'ingestion de glucose non marqué conjointement aux précurseurs néoglucogéniques marqués a causé une dilution supplémentaire de l'enrichissement en ¹³C du glucose circulant dont il est impossible de tenir compte. Malgré ces limitations, nous avons néanmoins réussi à tirer profit de la mesure de l'enrichissement en ¹³C du glucose circulant dans ces deux études. En effet, la comparaison de l'enrichissement en ¹³C du glucose circulant et du CO₂ expiré nous a permis d'apprécier, quoique de façon

qualitative, l'importance de la voie directe et indirecte d'oxydation du lactate et de l'alanine au cours de l'exercice, tel que cela a été discuté précédemment.

Dans l'étude 3, portant sur l'oxydation du glucose exogène chez des sujets sédentaires et entraînés, l'enrichissement en ^{13}C du glucose circulant, combiné à celui du CO_2 expiré, a été utilisé pour calculer le flux oxydatif du glucose endogène d'origine hépatique et musculaire. La méthode qui a été employée est essentiellement celle qui a été utilisée par le laboratoire de Noakes pour calculer le taux d'oxydation du glucose circulant à l'exercice [Derman et al., 1996]. La figure 42 présente un schéma résumant l'approche utilisée dans l'étude. Le taux d'oxydation du glucose exogène (G_{exo}) a été calculé à partir du VCO_2 mesuré à la bouche, ainsi que de l'enrichissement en ^{13}C du glucose exogène et du CO_2 expiré (flux A) selon l'équation suivante [Péronnet et al., 1990]:

Équation 32:

$$G_{\text{exo}} = \text{VCO}_2 [(R_{\text{exp}} - R_{\text{ref}}) / (R_{\text{exo}} - R_{\text{ref}})] / k$$

Où le VCO_2 est exprimé en L/min STPD, R_{exp} est l'enrichissement en ^{13}C du CO_2 expiré, R_{ref} est l'enrichissement en ^{13}C du CO_2 mesuré au repos avant l'ingestion de ^{13}C -glucose, R_{exo} est l'enrichissement en ^{13}C du glucose ingéré, et k est une constante (0,7426 L/g) représentant le volume de CO_2 produit lors de l'oxydation de 1 g de glucose.

Le taux d'oxydation de la totalité du glucose circulant (glucose exogène + glucose d'origine hépatique : flux A + B) a été calculé en utilisant le VCO_2 et l'enrichissement en ^{13}C du CO_2 expiré, mais cette fois-ci en utilisant l'enrichissement en ^{13}C du glucose circulant à la place de la valeur de R_{exo} (Équation 32). Le taux d'oxydation du glucose libéré par le foie (flux B) a été calculé par différence entre le taux d'oxydation de l'ensemble du glucose circulant et celui du glucose exogène. Finalement, le taux d'oxydation du glycogène musculaire (flux C) a été calculé par différence entre le taux d'oxydation du glucose, mesuré par calorimétrie indirecte respiratoire corrigée pour l'oxydation des protéines, et le taux d'oxydation du glucose circulant.

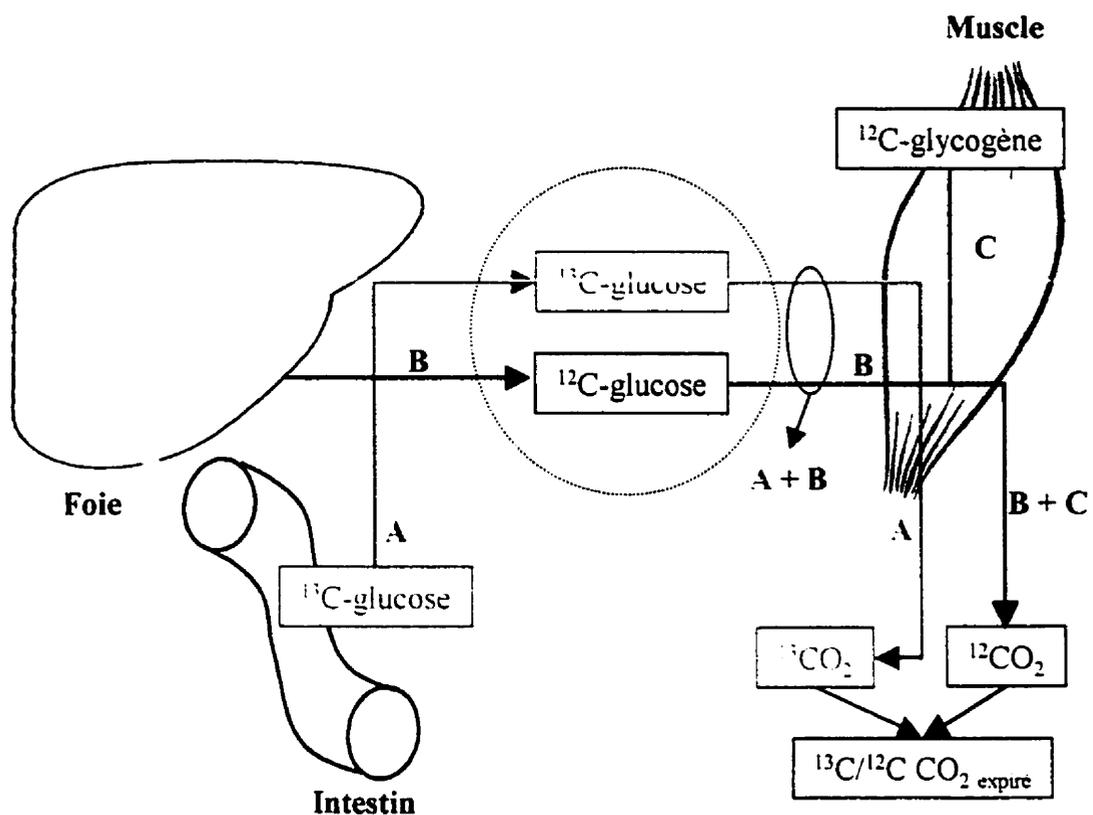


Figure 42: Principe de calcul de l'oxydation du glucose exogène, du glucose libéré par le foie et du glycogène musculaire lorsque du $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -glucose est ingéré.

Comme le montre la figure 42, lorsque le calcul de l'oxydation du glucose libéré par le foie est effectué, l'hypothèse est faite que celui-ci ne libère pas de glucose enrichi en ^{13}C . Or, comme cela a déjà été mentionné, lorsque du ^{13}C -glucose est ingéré, il existe un recyclage isotopique par le cycle de Cori et le cycle alanine-glucose qui fait en sorte que le foie libère du glucose marqué au ^{13}C (Figure 41A). Il est donc possible que l'oxydation du glucose d'origine hépatique, calculée par différence entre l'oxydation du glucose circulant et celle du glucose exogène, soit sous-estimée. Cependant, deux arguments nous portent à croire que l'importance que pourrait avoir cette sous-estimation est relativement faible.

Le premier argument est que la quantité totale de glucose produit par la néoglucogénèse au cours des protocoles expérimentaux de l'étude 3 est beaucoup plus faible que la quantité totale de glucose exogène ingéré. Au repos, en supposant une production hépatique de $12 \mu\text{moles.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (Tableaux 3,4 et 5) et une contribution relative de la néoglucogénèse à partir du PEP de 42 % [Diraison et al., 1998; Landau et al., 1995], la quantité totale de glucose qui aurait pu être produit par la néoglucogénèse au cours des 180 minutes d'observation est de l'ordre de 10 à 11 g, ce qui est 10 fois moins élevé que la quantité de glucose exogène ingérée (100 g). À l'exercice, en supposant une production hépatique de glucose de l'ordre de 30 à 40 $\mu\text{moles.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ [Coggan et al., 1995; McConnell et al., 1994; Mendenhall et al., 1994] et une contribution moyenne de la néoglucogénèse à partir du lactate, du pyruvate et de l'alanine de 10 % [Ahlborg et Bjorkman, 1990; Ahlborg et al., 1974; Felig et Wahren, 1971] une contribution mineure de la néoglucogénèse à l'apparition totale de glucose dans la circulation au cours des 90 minutes d'exercice est également obtenue (entre 3 et 5 g).

Le second argument est qu'en tenant compte de tous les phénomènes de dilution des isotopes présentés précédemment, le glucose marqué au ^{13}C issu de la néoglucogénèse à partir du lactate et de l'alanine marqués a probablement un enrichissement beaucoup plus faible que celui du ^{13}C -glucose provenant de l'intestin. Globalement, nous pensons donc que la contribution de la néoglucogénèse à

l'enrichissement en ^{13}C du glucose circulant est faible comparativement au glucose exogène, compte tenu de la faible quantité de glucose produit par cette voie et de la forte dilution isotopique qui y survient .

.1.3 Conclusion

Dans l'ensemble, la méthode utilisée dans notre laboratoire pour étudier le devenir oxydatif de substrats exogènes ainsi que du glucose endogène au repos ou à l'exercice présente deux limites. La première limite est qu'il est impossible de déterminer avec précision l'origine du $^{13}\text{CO}_2$ expiré à la bouche. La deuxième limite est que la mesure de l'enrichissement en ^{13}C du glucose circulant ne permet pas de déterminer l'activité de la néoglucogénèse. Cependant, tel que cela été discuté, il est raisonnable de penser que dans les conditions expérimentales utilisées dans nos études, ces limitations sont sans grand impact sur l'interprétation des résultats.

Par ailleurs, les limites auxquelles notre méthode fait face sont communément rencontrées avec plusieurs techniques de traçage utilisées dans l'étude du métabolisme *in vivo*. Les limites se résument à la difficulté de s'assurer que le devenir métabolique du traceur isotopique utilisé est un bon reflet de l'activité de la voie métabolique étudiée. Cette difficulté a bien été mise en évidence pour la néoglucogénèse dans la revue de la littérature. La récente remise en cause [Landau et al., 1996; Previs et al., 1996] de la validité de la mesure du taux d'apparition du glycérol (R_a glycérol) pour mesurer le flux de la lipolyse constitue un autre exemple. En effet, la validité de cette approche repose sur l'hypothèse que 1) le glycérol est relâché dans un rapport 1:3 avec les acides gras libres lors de la lipolyse, 2) le muscle ne possède pas une activité glycérol kinase suffisamment élevée pour oxyder directement le glycérol issu de la lipolyse intramusculaire, et que 3) le foie et les reins ne relâchent pas de glycérol en quantités suffisantes pour surestimer la lipolyse. Or, il a été démontré que le foie et les reins étaient responsables de l'apparition de 8 à 18 % du glycérol en circulation [Previs et al., 1996] et que le muscle avait vraisemblablement une capacité relativement élevée à capter du glycérol [Elia et al., 1993; Kurpad et al., 1994; Landau et al., 1996]. Notre étude portant sur l'oxydation du glycérol exogène (Étude 3) est en accord avec ces

constatations et indique que le glycérol pourrait être oxydé de manière significative par le muscle au travail.

.2 Mécanismes impliqués dans l'augmentation de la capacité néoglucogénique induite par l'entraînement

Les résultats de plusieurs études menées *in vivo* chez le Rat à l'aide de traceurs isotopiques ont montré que l'entraînement en endurance augmentait la capacité néoglucogénique du foie [Brooks et Donovan, 1983; Donovan et Pagliassotti 1990; Donovan et Sumida 1990; Donovan et Pagliassotti, 1989; Donovan et Brooks, 1983; Turcotte et Brooks, 1990]. Ces observations ont été confirmées de manière directe par des études *in vitro*. En effet, une augmentation de la néoglucogénèse à partir du lactate et de l'alanine a été rapportée sur des foies isolés perfusés [Sumida et Donovan, 1995; Sumida et al., 1993]. Un accroissement de la néoglucogénèse à partir du lactate a également été rapporté sur des tranches de foie incubées [Podolin et al., 1996; Podolin et al., 1994]. Dans l'étude 4 de la thèse, les expériences d'incubation d'hépatocytes isolés de rats sédentaires et entraînés ont confirmé que l'entraînement augmentait la néoglucogénèse à partir du lactate – pyruvate et de l'alanine. Cet effet a également été observé en périfusion avec des concentrations sous saturantes d'alanine. De plus, les expériences d'incubation d'hépatocytes ont également montré que l'entraînement augmentait la néoglucogénèse à partir du glycérol et du DHA (Figure 43).

De façon générale, les études qui se sont directement intéressées à la question des mécanismes ont tenté d'associer l'augmentation du flux néoglucogénique observée en réponse à l'entraînement à l'accroissement de l'activité de certaines enzymes considérées «limitantes» pour la néoglucogénèse. Comme cela a été mentionné dans la revue de la littérature, les résultats de ces études n'ont pas permis d'identifier les mécanismes potentiellement impliqués dans l'accroissement du flux néoglucogénique en réponse à l'entraînement. En effet, il a été montré que l'entraînement ne modifiait pas l'activité de la PC [Horn et al., 1997; Huston et al., 1975] et de la PEPCK [Horn et al., 1997; Huston et al., 1975; Sumida et al., 1993; Winder, 1985], ainsi que l'expression de l'ARNm de la PEPCK [Horn et al., 1997]. Horn et al. [1997] ont conclu que

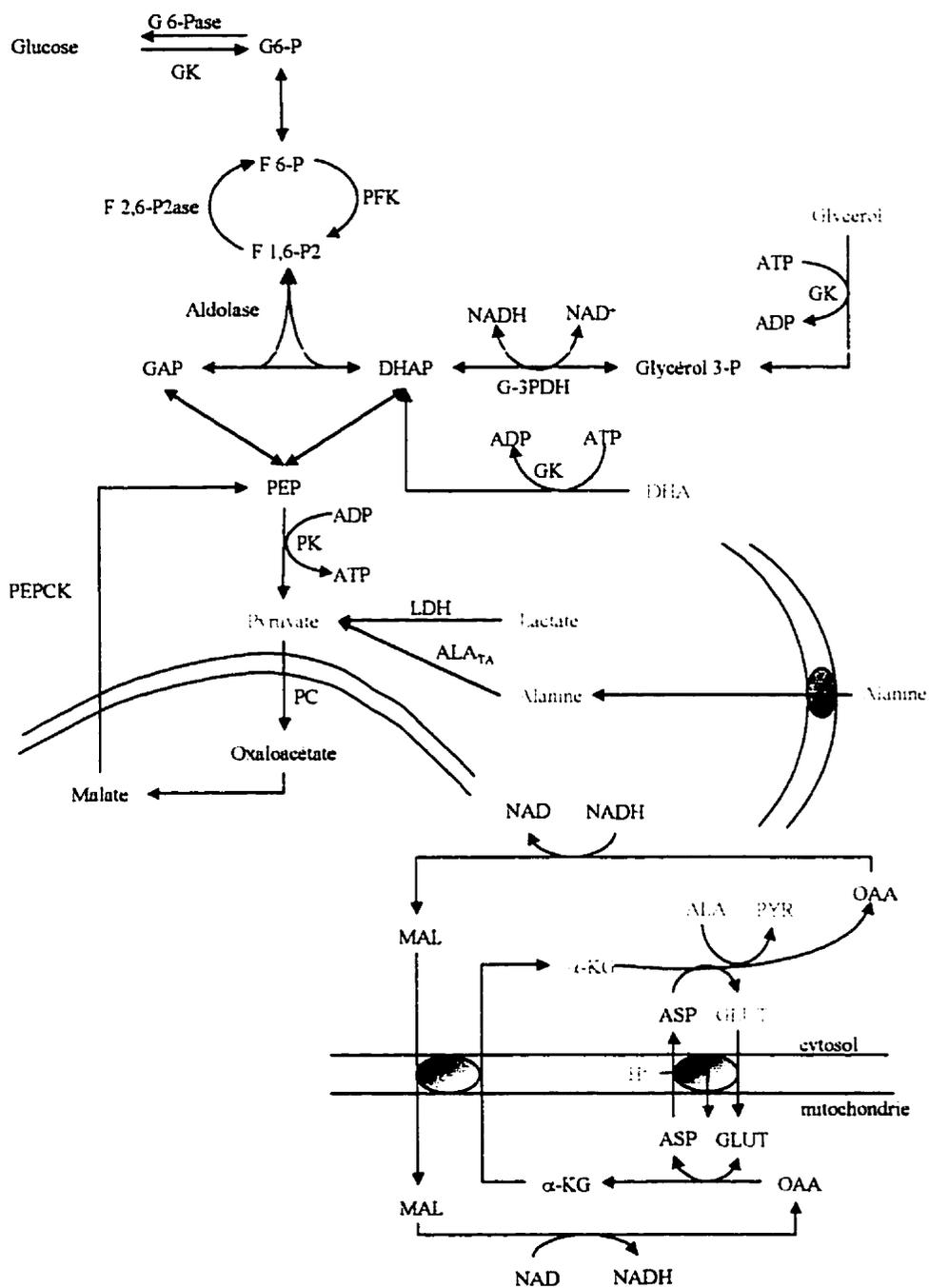


Figure 43: Schéma de la voie de la néoglucogénèse et de la navette malate-aspartate. α -KG: α -cétoglutarate; ALA: alanine; ALA_{TA} : Alanine transaminase; ASP: aspartate; DHA: dihydroxyacétone; DHAP: dihydroxyacétone-phosphate; F6-P: fructose 6-phosphate; F1,6 P2: fructose 1,6 biphosphate; F1,6-P2ase: fructose 1,6 biphosphatase G3-PDH: glycérol 3-phosphate deshydrogénase; G6-Pase: glucose 6-phosphatase GK: glycérol kinase; GLUT: glutamate; HK: hexokinase; MAL: malate; OAA: oxaloacétate; PC: pyruvate carboxylase; PEP: phosphoenolpyruvate; PEPCK: phosphoenol-pyruvate carboxykinase; PFK:phosphofructokinase PGM: phosphoglucomutase; PK: pyruvate kinase; PYR: pyruvate; GAP: glycéraldéhyde 3-P; G6-P: glucose 6-phosphate;

l'augmentation de la capacité néoglucogénique à partir du lactate induite par l'entraînement n'était donc pas due à des modifications au niveau de la PC et de la PEPCK. Or les réactions que ces enzymes catalysent sont généralement considérées comme importantes dans le contrôle de la néoglucogénèse à partir du lactate et du pyruvate [Groen et al., 1986; Rigoulet et al., 1987]. Quant à l'activité de l'alanine transaminase, impliquée dans la transamination de l'alanine en pyruvate, Sumida et Donovan [1995] ont montré qu'elle était inchangée en réponse à l'entraînement. Par contre, Ji et al. [1986] ont rapporté une augmentation de l'activité de cette enzyme, mais seulement dans le compartiment mitochondrial. Or, chez le Rat, il a été démontré que l'alanine était presque exclusivement transaminé dans le cytosol [Groen et al., 1982]. À la lumière de ces résultats, Sumida et Donovan [1995] ont émis l'hypothèse que l'étape de la transamination de l'alanine en pyruvate n'était vraisemblablement pas impliquée dans l'augmentation du flux néoglucogénique à partir de l'alanine. Et pourtant, tel que cela a été discuté dans l'étude 4 de la thèse, il est bien admis que l'étape catalysée par l'alanine aminotransférase exerce un contrôle important sur le flux de la néoglucogénèse à partir de l'alanine lorsque sa concentration est élevée [Boon et Meijer, 1992; Fafournoux et al., 1983; Groen et al., 1982; Malette et al., 1969; McGivan et al., 1981]. Finalement, quelques études ont rapporté que l'entraînement était associé à l'augmentation de l'activité de certaines enzymes telles que l'aspartate transaminase [Sumida et Donovan, 1995], la malate deshydrogénase [Ji et al., 1986] et la succinate deshydrogénase [Kraus et Kirsten, 1970], qui ne sont cependant pas classiquement considérées comme «limitantes» pour la néoglucogénèse. Globalement, il semble donc que les études qui ont tenté d'appréhender les mécanismes responsables de l'augmentation de la capacité néoglucogénique induite par l'entraînement en mesurant les changements de l'activité des enzymes de la néoglucogénèse, ont amené plus de confusion que de réelles avancées.

.2.1 Augmentation de flux sans augmentation de l'activité enzymatique

Un élément qui pourrait contribuer à clarifier la situation est qu'il est tout à fait possible que l'entraînement augmente le flux à travers une étape précise de la voie néoglucogénique, sans qu'il y ait nécessairement une augmentation de l'activité de

l'enzyme impliquée. Cette éventualité ne semble pas avoir été envisagée auparavant puisqu'il a toujours été plus ou moins admis que toute augmentation du flux néoglucogénique devait s'accompagner de l'augmentation de l'activité d'enzymes qui catalysent des étapes «limitantes» dans la voie métabolique. Or certaines évidences suggèrent que ceci pourrait ne pas être le cas.

Dans l'étude 4 de la thèse, nous avons trouvé qu'une augmentation de la transamination de l'alanine en pyruvate était responsable de l'accroissement du flux néoglucogénique induit par l'entraînement, lorsque des concentrations élevées d'alanine (de 1,2 à 9,8 mM) étaient utilisées en périfusion. Tel que cela a été discuté, ce résultat est en accord avec plusieurs études qui ont montré que pour des concentrations élevées d'alanine, la néoglucogénèse était principalement contrôlée par l'étape de la transamination [Boon et Meijer, 1992; Malette et al., 1969]. Étant donné que l'activité de l'alanine transaminase est élevée dans le foie ($60 \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ poids sec: Sumida et Donovan, 1995), Boon et Meijer [1992] ont suggéré, et ensuite confirmé que cette enzyme exerçait un contrôle important sur le flux de la néoglucogénèse, parce qu'elle était limitée par l'apport en α -cétoglutarate. Dans l'étude 4, nous avons justement rapporté des évidences indirectes suggérant que l'entraînement pourrait accroître l'apport en α -cétoglutarate pour l'alanine transaminase. En effet, la consommation d' O_2 ainsi que la force proton motrice mitochondriale (telle qu'appréciée indirectement par le rapport $\text{NADH}/\text{NAD}_{\text{cytosolique}} / \text{NADH}/\text{NAD}_{\text{mitochondrial}}$) des hépatocytes de rats entraînés étaient significativement plus élevées que dans les hépatocytes de rats sédentaires. Or, ces deux paramètres sont des déterminants majeurs de l'activité de la navette malate-aspartate (Figure 43), qui est responsable de l'apport en α -cétoglutarate dans le cytosol [Kunz et Davis, 1991]. Ces résultats suggèrent donc que l'absence de modification de l'activité enzymatique de l'alanine transaminase rapportée par Sumida et Donovan [1995], n'est pas incompatible avec le fait que l'étape de la transamination soit impliquée dans l'adaptation à l'entraînement. Il est même possible de dire qu'il n'est pas tout à fait surprenant qu'il en soit ainsi. En effet, tel que mentionné précédemment chez le Rat sédentaire, l'activité de cette enzyme est déjà environ 60 fois plus élevée que le flux néoglucogénique maximal observé à partir de l'alanine.

Dans le cas du lactate-pyruvate, les analyses de contrôle métaboliques menées par Groen et al. [1986] et Rigoulet et al. [1987] ont montré que la néoglucogénèse à partir de ces substrats était principalement contrôlée par les trois étapes enzymatiques du cycle PEP-pyruvate, c'est à dire la PC, la PEPCK et la PK (Figure 43). En effet, le coefficient de contrôle de flux de ces trois étapes combinées sur la néoglucogénèse a été évaluée à environ 60 %. Le fait que ce cycle exerce un contrôle majeur en fait donc une cible privilégiée pour l'ensemble des stimuli qui modifient le flux néoglucogénique à partir du lactate-pyruvate. Par exemple, il a été démontré que l'hypoxie chronique [Pison et al., 1995] et le phénobarbital [Argaud et al., 1991] inhibaient la néoglucogénèse en réprimant l'expression de la PEPCK. Quant à la methformine, un hypoglycémiant oral, Argaud et al. [1993] ont montré qu'elle inhibait la néoglucogénèse en activant la PK. Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, il est donc plausible de penser que l'effet stimulant exercé par l'entraînement en endurance sur la néoglucogénèse à partir du lactate-pyruvate est causé par une ou des adaptations au niveau des enzymes du cycle PEP-pyruvate.

Comme cela a été mentionné précédemment, aucune augmentation de l'activité de la PC [Horn et al., 1997; Huston et al., 1975] et de la PEPCK [Horn et al., 1997; Huston et al., 1975; Sumida et al., 1993; Winder, 1985], ainsi que de l'ARNm de la PEPCK [Horn et al., 1997] n'a été rapportée en réponse à l'entraînement. Compte tenu qu'aucune information n'était disponible au sujet de l'effet de l'entraînement sur la PK, une des hypothèses restantes était que l'entraînement augmentait la néoglucogénèse à partir du lactate-pyruvate en inhibant la PK. Dans l'étude 4, nous avons évalué l'effet de l'entraînement en endurance sur le flux de la PK en incubant des hépatocytes de rats entraînés et sédentaires en présence de DHA. Les résultats obtenus ont montré que le flux à travers l'étape de la PK était similaire dans les hépatocytes de rats entraînés et sédentaires. Nous avons donc formulé l'hypothèse que de manière similaire à ce qui a été décrit précédemment pour l'alanine transaminase, l'entraînement pourrait augmenter l'apport en oxaloacétate à la PEPCK. Bien que cette hypothèse demande à être vérifiée, elle est intéressante dans la mesure où elle permet d'expliquer comment l'étape de la

PEPCK, qui est importante dans le contrôle de la néoglucogénèse à partir du lactate-pyruvate, pourrait être impliquée dans la réponse à l'entraînement, sans recours à l'augmentation de son activité maximale ou de son expression.

Dans l'ensemble, l'emploi de la périfusion d'hépatocytes isolés dans l'étude 4 a permis de mettre en évidence que les mécanismes par lesquels l'entraînement accroît la capacité néoglucogénique du foie sont subtils. C'est d'ailleurs la subtilité de ces mécanismes qui ont jusqu'à présent rendu difficile leur identification à l'aide de la mesure de l'activité maximale d'enzymes «limitantes» de la néoglucogénèse. En effet, tel que cela a été discuté précédemment, cette approche expérimentale s'avère incapable de mettre en évidence toute modification du flux au travers d'une étape enzymatique qui n'est pas causée par une augmentation de l'activité enzymatique maximale. Ceci est principalement dû au fait que la mesure d'activités enzymatiques ne procurent aucun renseignement sur les conditions dans lesquelles les enzymes fonctionnent au sein d'une cellule active, puisque la concentration des substrats et des produits ainsi que des régulateurs potentiels de l'activité de ces enzymes est inconnue [Fell, 1997].

.2.2 Notion d'étape limitante versus concepts d'analyse de contrôle métabolique

Une deuxième limitation à la mesure d'activités enzymatiques *in vitro* est que cela ne permet pas de rendre compte des interactions complexes entre les différentes étapes de la voie dans le contrôle du flux néoglucogénique. C'est en partie à cause de cette limitation que nos hypothèses sont encore largement basées sur la notion qu'une étape limitante est responsable du contrôle du flux global à travers la voie de la néoglucogénèse. Jusqu'à récemment, aucun outil expérimental n'était disponible pour l'étude du contrôle des flux métaboliques dans un contexte intégré. Cependant, le développement de la théorie de l'analyse de contrôle métabolique par Kacser et Burns [1973] et Heinrich et Rapoport [1974] a doté les métaboliciens d'un outil quantitatif permettant ce genre d'investigation. L'application de cette approche pour l'étude de différentes voies telles la néoglucogénèse [Groen et al., 1986; Rigoulet et al., 1987], l'oxydation phosphorylante [Brown et Brand, 1986; Groen et al., 1982], et la glycolyse [Kashiwaya et al., 1994] a permis de dégager les deux grands concepts suivants: 1) le

contrôle du flux global à travers une voie métabolique est exercé non pas par une seule étape, mais bien par plusieurs et 2) l'importance du contrôle qu'exerce une étape particulière varie en fonction du type de substrat utilisé ainsi que de l'importance du flux global à travers la voie métabolique.

Les répercussions qu'ont ces concepts sur la compréhension des mécanismes par lesquels l'entraînement stimule la néoglucogénèse sont importantes. Par exemple, il est possible que l'augmentation du flux néoglucogénique à partir d'un précurseur donné soit due à la combinaison d'effets exercés sur plusieurs étapes contrôlantes. L'exemple d'un tel cas se présente dans l'étude 4. En effet, nous avons trouvé que le mécanisme impliqué dans l'augmentation de la néoglucogénèse à partir de l'alanine à la suite d'un entraînement était différent selon la concentration d'alanine périfusée. En effet, pour des concentrations d'alanine inférieure à environ 1 mM, l'augmentation du transport membranaire de l'alanine était vraisemblablement responsable de la hausse du flux néoglucogénique. Au contraire, pour des concentrations d'alanine supérieures à environ 1 mM, une augmentation de la transamination était le facteur responsable.

Les concepts de l'analyse de contrôle métabolique permettent également de concevoir que les effets de l'entraînement sur les étapes de la PC et de la PEPCK puissent expliquer l'augmentation de la néoglucogénèse à partir du lactate-pyruvate, sans que ces étapes aient un rôle à jouer dans l'augmentation de la néoglucogénèse à partir de l'alanine. En effet, pour que l'entraînement ait un effet sur le flux néoglucogénique à partir d'un précurseur donné il doit affecter une des étapes contrôlant la néoglucogénèse à partir de ce substrat. Or il est bien démontré que pour l'alanine, le contrôle est entièrement exercé par les deux étapes situées en amont du pyruvate, c'est à dire son transport membranaire et sa transamination en pyruvate [Boon et Meijer, 1992; Fafournoux et al., 1983; Groen et al., 1982; Malette et al., 1969; McGivan et al., 1981]. De la même façon, bien que le glycérol et le DHA entrent tous deux dans la voie de la néoglucogénèse au niveau du DHAP, la néoglucogénèse à partir de ces deux précurseurs est contrôlée par des mécanismes très différents (Figure 43). En effet, la néoglucogénèse à partir du glycérol, qui est un substrat beaucoup plus réduit que le DHA, est entièrement

dépendante du potentiel redox [Berry et al., 1973; Lerverve et al., 1985; Williamson et al., 1971]. Quant au DHA, les principales étapes contrôlantes sont son entrée dans la cellule et/ou sa phosphorylation en DHAP par la glycérol kinase, ainsi que l'étape de la PK [Lerverve et al., 1994].

.2.3 Conclusion

Au terme de cette thèse, deux raisons nous paraissent expliquer la confusion qui semble exister dans la littérature au sujet des mécanismes cellulaires responsables de l'augmentation de la capacité néoglucogénique induite par l'entraînement. La première raison est que l'approche expérimentale qui a généralement été utilisée et qui consiste à mesurer l'activité d'enzymes impliquées dans la néoglucogénèse n'est pas adéquate. La seconde raison est que la notion d'étape limitante qui est aujourd'hui considérée par les métaboliciens comme désuète [Fell, 1997], domine encore notre conception du contrôle des voies métaboliques.

Au cours de cette thèse, nous avons pu profiter des possibilités qu'offrent le modèle d'hépatocytes isolés et plus particulièrement la technique de périfusion pour étudier les mécanismes impliqués dans l'accroissement de la capacité néoglucogénique à partir de l'alanine. Cette technique pourrait s'avérer un outil de choix pour l'étude de plusieurs autres questions d'actualité au sujet des effets de l'entraînement sur le métabolisme hépatique du glucose. Une première application serait bien entendu l'étude des mécanismes par lesquels l'entraînement stimule la néoglucogénèse à partir du lactate-pyruvate, du glycérol ainsi que du DHA. Il serait également intéressant de voir comment l'entraînement affecte la néoglucogénèse dans les cellules périportales et périveineuses puisque cette question est totalement inconnue. Enfin, l'étude des mécanismes par lesquels l'entraînement augmente la sensibilité au glucagon serait une autre application intéressante car les mécanismes potentiels sont encore mal connus. L'entraînement pourrait accroître le nombre et/ou la sensibilité des récepteurs hépatiques au glucagon. Il pourrait également affecter des étapes situées en aval des récepteurs telles la synthèse de l'AMPc ou bien celle de la PK qui est une cible importante du glucagon.

3 Bibliographie

- Ahlborg, G., and O. Björkman. Splanchnic and muscle fructose metabolism during and after exercise. *J. Appl. Physiol.*, 69 (4): 1244-1251, 1990.
- Ahlborg, G., P. Felig, L. Hagenfeldt, R. Hendler, and J. Wahren. *Splanchnic and leg metabolism of glucose, free fatty acids, and amino acids*. *J. Clin. Invest.*, 53: 1080-1090, 1974.
- Argaud, D., H. Roth, N. Wiernsperger, and X.M. Lerverve. Metformin decrease gluconeogenesis by enhancing the pyruvate kinase flux in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 213: 1341-1348, 1993.
- Argaud, D., S. Halimi, F. Catelloni, and X.M. Lerverve. Inhibition of gluconeogenesis in isolated hepatocytes after chronic treatment with phenobarbital. *Biochem. J.* 280: 663-669, 1991.
- Bergman, B. C., M. A. Horning, G. A. Casazza, E. E. Wolfel, G. E. Butterfield, and G. A. Brooks. Endurance training increases gluconeogenesis during rest and exercise in men. *Am. J. Physiol.*, 278: E244-E251, 2000.
- Boon, L., and A.J. Meijer. Role of amino-acid transport across the plasma membrane in the control of metabolic pathways in hepatocytes. *In: Molecular mechanisms of transport* (E. Quagliariello & F. Palmieri, eds.), Amsterdam: Elsevier, 1992, p. 283-290.
- Brooks, G.A., and G.A. Gaesser. End points of lactate and glucose metabolism after exhausting exercise. *J. Appl. Physiol.* 49: 1057-1069, 1980.
- Brooks, G. A., and C. M. Donovan. Effect of endurance training on glucose kinetics during exercise. *Am. J. Physiol.*, 244 (Endocrinol. Metab. 7): E505-512, 1983.
- Brown, G.C., and M.D. Brand. Changes in permeability to protons and other cations at high proton motive force in Rat isolated mitochondria. *Biochem. J.* 234: 75-81, 1986.
- Christensen, H.N. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol. Rev.* 70: 43-77, 1990.
- Coggan, A. R., S. C. Swanson, L. A. Mendenhall, D. L. Habash, and C. L. Kien. Effect of endurance training on hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during

prolonged exercise in men. *Am. J. Physiol.*, 268 (Endocrinol. Metab. 31): E375-E383, 1995.

Dela, F. On the influence of physical training on glucose homeostasis. *Acta. Physiol. Scand.* 635:1-41, 1996.

Derman, K.D., J.A. Hawley, T.D. Noakes, and S.C. Dennis. Fuel kinetics during intense running and cycling when fed carbohydrates. *Eur. J. Appl. Physiol.* 74 : 36-43, 1996.

Diraison, F., V. Large, H. Brunengraber, and M. Beylot. Non-invasive tracing of liver intermediary metabolism in normal subjects and in moderately hyperglycaemic NIDDM subjects. Evidence against increased gluconeogenesis and hepatic fatty acid oxidation in NIDDM. *Diabetologia*, 41: 212-220, 1998.

Donovan, C. M., and F. D. Sumida. Training improves glucose homeostasis in rats during exercise via glucose production. *Am. J. Physiol.*, 258 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 27): R770-R776, 1990.

Donovan, C. M., and M. J. Pagliassotti. Enhanced efficiency of lactate removal after endurance training. *J. Appl. Physiol.*, 68 (3): 1053-1058, 1990.

Donovan, C. M., and M. J. Pagliassotti. Endurance training enhances lactate clearance during hyperlactatemia. *Am. J. Physiol.*, 257 (Endocrinol. Metab. 20): E782-E789, 1989.

Donovan, C. M., and G. A. Brooks. Endurance training affects lactate clearance, not lactate production. *Am. J. Physiol.*, 244 (Endocrinol. Metab. 7): E83-E92, 1983.

Elia, M., K. Khan, G. Calder, A. Kurpad. Glycerol exchange across the human forearm assessed by a combination of tracer and arteriovenous exchange techniques. *Clin. Sci.* 84: 99-104, 1993.

Fafournoux, P., C. Rémésy, and C. Demigné. Control of alanine metabolism in rat liver by transport processes or cellular metabolism. *Biochem. J.* 210: 645-652, 1983.

Felig, P., and J. Wahren. Amino acid metabolism in exercising man. *J. Clin. Invest.*, 50: 2703-2714, 1971.

Fell, D. *Understanding the control of metabolism.* Edited by K. Snell. London: Portland, 1997, p 301.

- Groen, A.K., R.J.A. Wanders, H.V. Westerhoff, R. van Der Meer, and J.M. Tager.** Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *J. Biol. Chem.* 257: 2754-2757, 1982.
- Groen, A.K., C.W. van Roermund, R.C. Vervoorn, and J.M. Tager.** Control of gluconeogenesis in rat liver cells. Flux control coefficients of the enzymes in the gluconeogenic pathway in the absence and presence of glucagon. *Biochem J.* 237:379-89, 1986.
- Groen, A.K., H.J. Sips, R.C. Vervoon, and J.M. Tager.** Intracellular compartmentation and control of alanine metabolism in rat liver parenchymal cells. *Eur. J. Biochem.* 122: 87-93, 1982.
- Heinrich, R., and T.A. Rapoport.** A linear steady-state treatment of enzymatic chains. General properties, control, and effectors strength. *Eur. J. Biochem.* 42: 89-95, 1974.
- Hetenyi Jr., G.** Correction for the metabolic exchange of ^{14}C for ^{12}C atoms in the pathway of gluconeogenesis in Vivo. *Federation Proc.*, 41: 104-109, 1982.
- Hetenyi Jr., G., R. A. Layberry, D. M. Foster, and M. Berman.** Transfer of carbon atoms among circulating glucose, alanine, and lactate in pancreatectomized dogs. *Am. J. Physiol.*, 239 (Endocrinol. Metab. 2): E39-E44, 1980.
- Horn, D.B., D.A. Podolin, J.E. Friedman, D.A. Scholnick, and R.S. Mazzeo.** Alterations in key gluconeogenic regulators with age and endurance training. *Metabolism.* 46: 414-419, 1997.
- Huston, R.L., P.C. Weiser, G.L. Dohm, E.W. Askew, and J.B. Boyd.** Effects of training, exercise and diet on muscle glycolysis and liver gluconeogenesis. *Life. Sci.* 17: 369-376, 1975.
- Ji, L.L., D.L. Lennon, R.G. Kochan, F.J. Nagle, and H.A. Lardy.** Enzymatic adaptation to physical training under beta-blockade in the rat. Evidence of a beta 2-adrenergic mechanism in skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 78: 771-778, 1986.
- Kacser, H., and J.A. Burns.** The control of flux. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 27: 65-104, 1973.

- Kashiwaya, Y.K. Sato, N. Tsuchiya, S. Thomas, D.A. Fell, R.L. Veech, and J.V. Passonneau.** Control of glucose utilization in working perfused rat heart. *J. Biol. Chem.* 269: 25502-25514, 1994.
- Katz, J.** Determination of gluconeogenesis in Vivo with ^{14}C -labeled substrates. *Am. J. Physiol.*, 248 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 17): R391-R399, 1985.
- Katz, J., and I. L. Chaikoff.** Synthesis via the Krebs: Cycle in the utilization of acetate by rat liver slices. *Biochim. Biophys. Acta.*, 18: 87-101, 1955.
- Kraus, H., and R. Kirsten.** Die wirkung von körperlichem auf mitochondriale Energie Produktion im Hermuskelder Leber. *Pflügers Arch.* 320: 334-347, 1970.
- Kunz, W.S., and E.J. Davis.** Control of reversible intracellular transfer of reducing potential. *Arch. Biochem. Biophys.* 284: 40-46, 1991.
- Kurpad, A., K. Khan, A.G. Calder, S. Coppack, K. Frayn, I. Macdonald, M. Elia.** Effect of noradrenaline on glycerol turnover and lipolysis in the whole body and subcutaneous adipose tissue in humans in vivo. *Clin. Sci.* 86: 177-184, 1994.
- Landau, B. R., J. Wahren, S. F. Previs, K. Ekberg, V. Chandramouli, and H. Brunengraber.** Glycerol production and utilization in humans : sites and quantitation. *Am. J. Physiol.*, 271: E1110-1117, 1996.
- Large, V., M. Soloviev, H. Brunengraber, and M. Beylot.** Lactate and pyruvate isotopic enrichments in plasma and tissues of postabsorptive and starved rats. *Am. J. Physiol.*, 268: E880-888, 1995.
- Leverve, X.M., E. Fontaine, F. Putod-Paramelle, and M. Rigoulet.** Decrease in cytosolic ATP/ADP ratio and activation of pyruvate kinase after in vitro addition of almitrine in hepatocytes isolated from fasted rats. *Eur. J. Biochem.* 224: 967-974, 1994.
- Leverve, X.M., A.K. Groen, A.J. Verhoeven, and J.M. Tager.** Kinetic analysis of short-term effects of α -agonists on gluconeogenesis in isolated hepatocytes. *FEBS lett.* 181: 43-46, 1985.
- Malette, L.E., J.H. Exton, and C.R. Park.** Effects of glucagon on amino acid transport and utilization in the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 244: 5724-5728, 1969.

- Mazzeo, R. S., G. A. Brooks, D. A. Schoeller, and T. F. Budinger.** Disposal of blood [$1-^{13}\text{C}$] lactate in humans during rest and exercise. *J. Appl. Physiol.*, 60: 232-241, 1986.
- McConell, G., S. Fabris, J. Proietto, and M. Hargreaves.** Effect of carbohydrate ingestion on glucose kinetics during exercise. *J. Appl. Physiol.*, 77 (3): 1537-1541, 1994.
- McGivan, J.D., Ramsell J.C., and J.H. Lacey.** Stimulation of alanine transport and metabolism by dibutyryl cyclic AMP in the hepatocytes from fed rats. Assessment of transport as a potential rate-limiting step for alanine metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 644: 295-304, 1981.
- Mendenhall, L. A., S. C. Swanson, D. L. Habash, and A. R. Coggan.** Ten days of exercise training reduces glucose production and utilization during moderate-intensity exercise. *Am. J. Physiol.*, 266 (Endocrinol. Metab. 29): E136-E143, 1994.
- Péronnet, F., N. Rheaume, C. Lavoie, C. Hillaire-Marcel, and D. Massicotte.** Oral [^{13}C]glucose oxidation during prolonged exercise after high- and low-carbohydrate diets. *J. Appl. Physiol.*, 85 (2): 723-730, 1998.
- Péronnet, F., D. Massicotte, G. R. Brisson, and C. Hillaire-Marcel.** Use of ^{13}C substrates for metabolic studies in exercise: methodological considerations. *J. Appl. Physiol.*, 69 (3): 1047-52, 1990.
- Pilegaard, H., J. Bangsbo, E.A. Richter, C. Juel.** Lactate transport studied in sarcolemmal giant vesicles from human muscle biopsies: relation to training status. *J. Appl. Physiol.* 77: 1858-1862, 1994.
- Pison, C.M., C. Chauvin, E. Fontaine, F. Catelloni, C. Keriél, B. Paramelle, and X.M. Leverve.** Mechanism of gluconeogenesis inhibition in rat hepatocytes isolated after in vivo hypoxia. *Am. J. Physiol.* 268: E965-E973, 1995.
- Podolin, D. A., T. T. Gleeson, and R. S. Mazzeo.** Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis: Influence of age and training. *Am. J. Physiol.*, 270 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 39): R365-R372, 1996.

Podolin, D.A., T.T. Gleeson, and R.S. Mazzeo. Role of norepinephrine in hepatic gluconeogenesis: evidence of aging and training effects. *Am. J. Physiol.* 267: E680-E686, 1994.

Previs, S. F., K. S. Martin, J. W. Hazey, M. V. Soloviev, A. P. Keating, D. Lucas, F. David, J. Koshy, D. W. Kirschenbaum, K.-Y. Tserng, and H. Brunengraber. Contributions of liver and kidneys to glycerol production and utilization in the dog. *Am. J. Physiol.*, 271: E1118-E1124, 1996.

Rennie, M.J., A. Ahmed, S.E. Khogali, S.Y. Low, H.S. Hundal, and P.M. Taylor. Glutamine metabolism and transport in skeletal muscle and heart and their clinical relevance. *J Nutr.* 126:1142S-1149S, 1996.

Rigoulet, M., X.M. Leverve, P.J.A. Plomp, and A.J. Meijer. Stimulation by glucose of gluconeogenesis in hepatocytes isolated from starved rats. *Biochem. J.* 245: 661-668, 1987.

Roth, D. A. The sarcolemmal lactate transporter: transmembrane determinants of lactate flux. *Med. Sci. Sports Exercise*, 23: 925-934, 1991.

Shotwell, M.A., M.S. Kilberg, and D.L. Oxender. The regulation of neutral amino acid transport in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 737: 267-284, 1983.

Stanley, W. C., J. A., Wisneski, E. W. Gertz, R. A. Neese, and G. A. Brooks. Glucose and lactate interrelations during moderate-intensity exercise in humans. *Metabolism*, 37 (9): 850-858, 1988.

Strisower, E. H., G. D. Kohler, and I. L. Chaikoff. Incorporation of acetate carbon into glucose by liver slices from normal and alloxan-diabetic rats. *J. Biol. Chem.*, 198: 115-126, 1952.

Sumida, K.D., and C.M. Donovan. Enhanced hepatic gluconeogenic capacity for selected precursors after endurance training. *J. Appl. Physiol.* 79: 1883-1888, 1995.

Sumida, K.D., J.H. Urdiales, and C.M. Donovan. Enhanced gluconeogenesis from lactate in perfused livers after endurance training. *J. Appl. Physiol.* 74: 782-787, 1993.

Turcotte, L. P., and G. A. Brooks. Effects of training on glucose metabolism of gluconeogenesis-inhibited short-term-fasted rats. *J. Appl. Physiol.*, 68 (3): 944-954, 1990.

Weinman, E. O., E. H. Strisower, and I. L. Chaikoff. Conversion of fatty acids to carbohydrate. Application of isotopes to this problem and role of Krebs Cycle as a synthetic pathway. *Physiol. Rev.*, 37: 252-272, 1957.

Williamson, J.R., A. Jakob, and C. Refino. Control of the removal of reducing equivalents from the cytosol in perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* 246: 7632-41, 1971.

Winder, W.W. Regulation of hepatic glucose production during exercise. *Exerc. Sport Sci. Rev.*