



Université de Montréal

**Effets de l'ovariectomie et de l'activité physique sur l'homéostasie du  
glucose chez les rates ZDF**

Par

Junior S. Mentor

Département de kinésiologie

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales

En vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M.Sc.),

en Sciences de l'activité physique

option physiologie de l'exercice

Juin 2011

© Junior S. Mentor, 2011

Université de Montréal

Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Effets de l’ovariectomie et de l’activité physique sur l’homéostasie du  
glucose chez les rates ZDF**

Présenté par :

Junior S. Mentor

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Daniel Curnier Ph.D.

*Président-rapporteur*

Raynald Bergeron Ph.D.

*Directeur de recherche*

Marie-Ève Mathieu Ph.D.

*Membre du jury*

## Résumé et mots clés (Français)

**Introduction:** La ménopause est associée à l'insulino-résistance et augmente le risque de diabète de type 2 (DT2) chez les sujets sains. Cependant, peu d'informations existent à savoir comment la ménopause et l'activité physique peuvent influencer l'homéostasie du glucose chez des sujets insulino-résistants. **Objectifs:** Déterminer 1) l'effet du retrait des œstrogènes ovariens par ovariectomie sur l'homéostasie du glucose des rates ZDF (Zucker Diabetic Fatty; prédisposées au diabète de type 2) et 2) évaluer l'influence de l'activité physique volontaire sur ces réponses. **Méthodologie:** Vingt-quatre rates furent d'abord nourries et hébergées dans des cages conventionnelles les 28 premiers jours pour ensuite subir une ovariectomie (OVX,  $n=16$ ) ou une opération simulée (SHAM-Inactive,  $n=8$ ). Les rates ovariectomisées furent ensuite assignées au groupe entraîné volontairement dans une cage à roue (OVX-Active,  $n=8$ ) ou demeurèrent sédentaires (OVX-Inactive,  $n=8$ ) pendant les 44 jours suivants. **Résultats:** Au jour 56, la glycémie à l'état nourri fut significativement augmentée par l'ovariectomie ( $p<0,01$ ) et ramenée au niveau initial chez les rates OVX-Active ( $p<0,01$ ). L'ovariectomie diminua la captation de glucose induite par l'insuline dans le muscle de façon significative ( $0,63 \pm 0,08$  vs  $1,13 \pm 0,27$   $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). L'entraînement améliora la tolérance au glucose ( $p<0,01$ ) ainsi que la prise de glucose induite par l'insuline dans le muscle ( $p<0,05$ ). **Conclusion:** Le retrait des estrogènes ovariens par ovariectomie perturbe l'homéostasie du glucose chez les rates ZDF femelles, sans pour autant provoquer le diabète de type 2. L'activité physique a un effet bénéfique sur l'homéostasie du glucose malgré la perte d'estrogènes ovariens.

**Mots clés:** ovariectomie, exercice, récepteurs à estrogène, course volontaire, captation du glucose, ménopause

**Abstract and keywords (Anglais)**

**Introduction:** Menopause is associated with insulin resistance and increased risks of type 2 diabetes in healthy human subjects. However, little is known about its effects on glucose homeostasis in insulin-resistant subjects. **Aims:** Our aim was to study 1) the effects of ovariectomy and 2) voluntary physical activity on glucose homeostasis in ZDF (Zucker diabetic fatty) female rats, a well-known animal model of insulin resistance and diabetes. **Methodology:** Twenty-four rats were fed and housed in standard cages during 28 days after which they either underwent an ovariectomy (Ovx) or a sham operation (SHAM-Inactive,  $n=8$ ). The ovariectomized rats either engaged in voluntary wheel cage running (OVX-Active,  $n=8$ ) or remained inactive (OVX-Inactive,  $n=8$ ) for the following 44 days. **Results:** Fed glycaemia at day 56 was significantly increased by Ovx ( $p<0.01$ ) and lowered back to control level in OVX-Active rats ( $p<0.01$ ). Ovx significantly decreased insulin-stimulated muscle glucose uptake ( $0.63 \pm 0.08$  vs  $1.13 \pm 0.27 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). OVX-Inactive rats also showed increased triglyceride ( $p<0.001$ ) and lower glycogen ( $p<0.001$ ) contents in their liver whereas pancreatic insulin content was increased ( $p<0.05$ ) as compared to SHAM-Inactive rats. Training markedly improved glucose tolerance ( $p<0.01$ ) and insulin-stimulated muscle glucose uptake ( $p<0.05$ ) as compared to SHAM-Inactive rats. Ovx-induced alterations in pancreatic insulin content ( $p<0.01$ ) and liver glycogen ( $p<0.05$ ) were improved by physical activity. **Conclusion:** Our data suggest that ovariectomy-induced loss of ovarian estrogens impairs glucose homeostasis in female ZDF rats without triggering overt type 2 diabetes. Physical activity improves glucose homeostasis despite the estrogen loss.

**Key words:** ovariectomy, exercise, estrogen receptors, voluntary running, muscle glucose uptake, menopause

## Table des matières

Résumé et mots-clés (Français).....	i
Abstract and keywords (Anglais).....	ii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des sigles et abréviations.....	viii
Remerciements.....	x
1. Introduction.....	1
1.1 Mise en contexte.....	1
1.2 La ménopause.....	2
1.2.1 Termes et définitions.....	2
1.2.2 Biologie des œstrogènes.....	3
1.3 Homéostasie du glucose et diabète du type 2.....	4
1.4 Homéostasie musculaire du glucose.....	6
1.5 Homéostasie pancréatique du glucose.....	9
2. Projet d'étude : les effets de l'ovariectomie et de l'activité physique sur l'homéostasie du glucose chez les rates ZDF.....	11
2.1 Objectifs.....	11
2.2 Modèle animal : la rate ZDF.....	11
2.3 Interventions : ovariectomie et entraînement volontaire.....	13
2.4 Implication personnelle dans le projet.....	14
3. La ménopause peut-elle précipiter la pathogénèse du diabète de type 2 ?.....	16
3.1 Rôle des œstrogènes dans l'homéostasie du glucose.....	16
3.2 Obésité, insulino-résistance et diabète du type 2.....	18
3.3 Homéostasie musculaire du glucose.....	23

3.4 Homéostasie pancréatique du glucose.....	25
3.5 Première hypothèse de travail .....	26
4. L'activité physique peut-elle contrer les effets de la ménopause sur la pathogénèse du diabète de type 2 ? .....	28
4.1 Obésité, insulino-résistance et diabète de type 2.....	29
4.2 Homéostasie musculaire du glucose.....	31
4.3 Homéostasie pancréatique du glucose.....	32
4.4 Seconde hypothèse de travail .....	32
5. Article de l'étude <i>Physical activity protects against withdrawal of estrogen protection on glucose homeostasis in ZDF rats</i> .....	34
<i>Abstract</i> .....	36
<i>Introduction</i> .....	37
<i>Research design and methods</i> .....	40
<i>Results</i> .....	45
<i>Discussion</i> .....	48
<i>Conclusion</i> .....	56
<i>Acknowledgements</i> .....	57
<i>Conflict of interest</i> .....	57
<i>References</i> .....	58
<i>Figure legends</i> .....	63
6. Retour sur l'article et discussion .....	74
6.1 Résultats de l'étude .....	74
6.2 Rôle possible ER $\alpha$ et ER $\beta$ .....	78
6.3 Limites de l'étude.....	80
6.3.1 L'ovariectomie comme modèle animal de ménopause .....	80
6.3.2 Le moment choisi pour l'ovariectomie et la durée de l'étude.....	81

6.3.3 Mesure de l'activité physique.....	81
6.3.4 Mesure de l'expression génétique .....	82
7. Conclusion.....	84
Bibliographie.....	86
Annexe I : Demande d'autorisation de rédiger par articles.....	xi
Annexe II : Accord des co-auteurs.....	xii



**Liste des tableaux**

Tableau I : Tableau résumant l'évolution pathophysiologique vers le DT2 de l'homéostasie pancréatique du glucose, p. 10

**Liste des figures**

Figure 1 : Comparaison de la signalisation de la voie de l'insuline entre le muscle normal et le muscle insulino-résistant, p. 7

Figure 2 : Tableau résumant les principales dysfonctions de l'homéostasie musculaire du glucose en situation d'insulino-résistance, p. 7

Figure 3 : Schéma illustrant les rôles métaboliques principaux des œstrogènes au niveau du muscle squelettique, pancréas, tissu adipeux, foie et système nerveux central, p. 17

Figure 4 : Schéma illustrant les principaux effets métaboliques de l'activation des récepteurs d'œstrogènes  $\alpha$  et  $\beta$  par l'œstradiol (E2) au niveau du muscle squelettique, pancréas, tissu adipeux, foie et système nerveux central, p. 18

Figure 5 : Tableau illustrant les effets physiologiques de la suppression génétique de ER  $\alpha$  au niveau pancréatique, musculaire, hépatique et adipeux, p.24

Figure 6 : Schéma illustrant un continuum des problèmes de santé associés au mode de vie sous-jacent à l'insulino-résistance., p. 28

**Liste des sigles et abréviations**

Akt / PKB : (*Protein kinase B*) Protéine kinase B

AMPK : (*AMP-activated protein kinase*)

ArKO : (*Aromatase Knock-out*)

AS160 : (*Akt substrate 160*) Substrat 160 de l'Akt

ATP : Adénosine tri-phosphate

DT2 : Diabète de type 2

E1 : Estrone

E2 : Estradiol

E3 : Estriol

ER $\alpha$  : (*Estrogen receptor  $\alpha$* ) Récepteur d'œstrogène  $\alpha$

ER $\alpha$ KO : (*Estrogen receptor  $\alpha$  Knock-out*)

ER $\beta$  : (*Estrogen receptor  $\beta$* ) Récepteur d'œstrogène  $\beta$

ER $\beta$  : (*Estrogen receptor  $\beta$  Knock-out*)

FSH : (*Follicle-stimulating hormone*) Hormone folliculo-stimulante

GLUT4 : (*Glucose transporter 4*) Transporteur de glucose 4

GnRH : (*Gonadotropin-releasing hormone*) Gonadolibérine

GS : (*Glycogen synthase*) Glycogène synthétase

HK : Hexokinase

HK2 : Hexokinase 2

HRT : (*Hormone replacement therapy*) Hormonothérapie

IGI : (*Insulinogenic index*) Indice insulino-génique

IMC : Indice de masse corporelle

IR : (*Insulin receptor*) Récepteur d'insuline

IRS-1 : (*Insulin receptor substrate 1*) Substrat 1 du récepteur à l'insuline

LH : (*Luteinizing hormone*) Hormone lutéinisante

MAPK8/JnK : (*Mitogen-activated protein kinase 8*)

MCV : Maladie cardiovasculaire

n.s. : Non-significatif

Ob/ob : (*Obese*) Obèse

OGTT : (*Oral Glucose Tolerance Test*) Test oral de tolérance au glucose

OVX : Ovariectomie

p-Akt : (*phospho-Protein kinase B*) phospho-Protéine kinase B

PDK : (*Phosphoinositide-dependent protein kinase*)

PFKM: Phosphofructokinase

PI3-K : (*Phosphoinositol-3 kinase*)

PKC : (*Protein kinase C*)

PTEN : (*Phosphatase and tensin homolog*)

PTP-1B : (*Protein-tyrosine phosphatase 1B*)

Sirt1 : Sirtuine

SM : Syndrome métabolique

UCP2 : (*Uncoupling protein 2*)

WBISI : (*Whole-body insulin sensitivity index*) Indice corporel de sensibilité à l'insuline

ZDF : (*Zucker Diabetic Fatty*) Zucker gras et diabétique

## **Remerciements**

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de recherche Raynald Bergeron, professeur agrégé au département de Kinésiologie de l'Université de Montréal, qui m'a encadré tout au long de cette maîtrise et qui m'a fait partager son grand savoir et savoir-faire. C'est ainsi que malgré mon peu d'expérience en recherche, j'ai constaté que j'étais capable d'en faire. Soulignons également sa prévoyance, sa grande disponibilité et ses nombreux apports à mon apprentissage de la recherche. Je lui suis reconnaissant de m'avoir fait confiance pour mener ce projet à terme.

Je remercie Jean-Marc Lavoie, professeur titulaire du département de Kinésiologie de l'Université de Montréal. Le projet de recherche traité dans ce mémoire émane de son initiative. Grâce à sa grande expérience, son leadership et ses précieux conseils, j'ai pu cheminer et persévérer à travers l'accomplissement de mon projet de maîtrise. Je garderai longtemps en mémoire sa grande énergie et son enthousiasme.

Pierre Corriveau, agent de recherche au département de Kinésiologie de l'Université de Montréal, m'a été constamment d'une aide très précieuse. Technicien aguerri, il a su apporter son pragmatisme et son ingéniosité à l'exécution de mes diverses expériences en laboratoire. Je garde un bon souvenir de notre collaboration. Je lui souhaite tout le bien et tout le succès qu'il mérite.

J'exprime ma gratitude à Abdolnasser Pighon et Émilienne Tudor Ngo Sock, respectivement diplômé du doctorat en sciences de l'activité physique et étudiante au doctorat en sciences de l'activité physique. De part leur expérience comme étudiants de troisième cycle, ils ont souvent été mes mentors sur le terrain, tant sur le plan technique que personnel. Leur présence plus grande que nature au département a apporté une belle ambiance au quotidien. Ils ont su m'épauler lorsque s'en présentait la nécessité. Je souhaite dire merci à Isabelle Côté, également étudiante au doctorat en sciences de l'activité physique, sans qui mes expériences animales n'auraient pu suivre leur cours et avec qui j'ai eu grand plaisir à travailler au laboratoire comme en-dehors du laboratoire. Je tire une grande satisfaction de les avoir côtoyés.

Je tiens à remercier tous les stagiaires qui dans le cadre de leur travail dirigé ou de leur échange étudiant, ont contribué à la bonne marche du projet en apportant leur aide au laboratoire: Stéphanie Desmarais, Pierre-Mathieu Dubois, Charles Lafortune, Audrey Marie-Joseph et Jessika Therrien. Je ne les ai pas oubliés. Mes sincères salutations leurs sont adressées. Je mentionne enfin la sollicitude de Daniel Curnier et de Marie-Ève Mathieu, tous deux professeurs au département de Kinésiologie de l'Université de Montréal, d'accepter d'être rapporteurs et jury de ce mémoire.

Sur une note un peu plus « sentimentale », je dédie ce mémoire à mes parents et à mes proches, dont l'inspiration a été une source d'énergie. Ce mémoire n'aurait jamais été rédigé si je n'avais pas reçu d'eux toute l'énergie positive dont j'avais besoin pour aller jusqu'au bout de cette aventure. Tenons-nous le pour dit, ce mémoire est également leur mémoire.

## 1 Introduction

### 1.1 Mise en contexte

En raison du vieillissement des *baby-boomers* ainsi que d'une augmentation généralisée de l'espérance de vie, le nombre d'aînés est en lente mais constante progression au sein des pays industrialisés. En 2005, les Nations Unies estimaient qu'une personne sur dix était âgée de plus de 60 ans; il est maintenant prévu que cette proportion passera à une personne sur cinq en 2050 [1]. C'est ainsi que l'Amérique du Nord verra sa population âgée augmenter considérablement au cours des prochaines années. Ce développement, conjugué à un mode de vie souvent sédentaire, engendre son lot de défis en matière de santé publique pour nos sociétés. La progression des maladies cardiovasculaires (MCV), du syndrome métabolique (SM) ainsi que du diabète de type 2 (DT2) dans la population préoccupe grandement nombre d'experts et d'intervenants en matière de santé. Ces problèmes ne feront qu'accentuer la pression à laquelle font face nos systèmes de santé déjà fortement sollicités. Parmi la population âgée en pleine expansion, les femmes post-ménopausées semblent voir leurs problèmes de santé s'accentuer avec le déclin progressif de leur production d'œstrogènes à partir de la cinquantaine. Cela est d'autant plus vrai qu'avec une espérance de vie d'environ 80 ans au Canada [2], ces femmes passent plus de 30 ans dans un état de post-ménopause.

La prévalence de DT2 augmente avec le vieillissement de population, c'est ainsi que de plus en plus de femmes post-ménopausées se font traiter pour le DT2. Avec déjà environ 10% des femmes adultes aux prises avec le DT2 [3], on est en droit de se demander si les changements survenant à la ménopause en affecte la pathogénèse ainsi que la pathophysiologie; et comment cela se produit. Il existe à l'heure actuelle peu d'information à cet effet. S'il est vrai que le gain de poids survenant à l'âge de la ménopause est largement attribuable au vieillissement normal plutôt qu'à la ménopause elle-même, cette dernière a été indépendamment associée au gain de masse adipeuse et à la perte de masse musculaire [4, 5]. Il est bien connu que ces

changements de composition corporelle constituent eux-mêmes d'importants facteurs de risque ainsi que des facteurs aggravants pour le SM et le DT2. En effet, le gain adipeux et la perte musculaire sont tous les deux associés à une diminution de la sensibilité à l'insuline ainsi qu'à des altérations du métabolisme du glucose; aussi bien chez les femmes post-ménopausées que dans la population générale. Ajoutons que le SM touche environ 40% des femmes post-ménopausées [4]. Les changements associés à la ménopause peuvent donc s'avérer cliniquement importants.

Qui plus est, les femmes post-ménopausées sont plus enclines à un mode de vie sédentaire et au déconditionnement physique que les femmes pré-ménopausées [6]. Or, le manque d'activité physique ainsi qu'une diète inappropriée constituent les deux principaux facteurs comportementaux dans la pathogénèse du DT2 [7]. À l'opposé, les effets bénéfiques de l'activité physique sur la composition corporelle, la sensibilité à l'insuline et le métabolisme du glucose sont fort bien documentés [7]. Plusieurs études démontrent que les changements négatifs de composition corporelle survenant à l'âge de la ménopause peuvent être atténués par une augmentation de l'activité physique [4, 8, 9]. L'état de santé et la qualité de vie s'en trouvent alors également grandement améliorés [4], soulignant ainsi l'importance de la pratique régulière d'activité physique pour cette population.

## 1.2 La ménopause

### 1.2.1 Termes et définitions

La dégradation irréversible des follicules ovariens reliée au vieillissement résulte en la perte de la production des œstrogènes par les ovaires, l'arrêt des menstruations et à terme, l'infertilité. La cessation permanente des menstruations constitue donc la ménopause, définie rétrospectivement après 12 mois d'aménorrhée [10]. Aux États-Unis et en Europe, l'âge moyen de la ménopause est de 50-51 ans [11]. D'ailleurs, la ménopause est considérée prématurée lorsqu'elle survient avant l'âge de 40 ans [12].



Plusieurs termes sont utilisés pour décrire les années entourant la ménopause : transition de la ménopause, péri-ménopause, climactérique, etc. Cette nomenclature souvent confuse a été raffinée en 2001 pendant le STRAW (*Stages of reproductive aging workshop*) [10]. La péri-ménopause, aussi appelée la climactérique fut définie comme la période s'étendant du début des cycles menstruels irréguliers (variation de la longueur du cycle plus grand que 7 jours) jusqu'à 12 mois après la dernière période menstruelle (seulement reconnaissable *post hoc*). La transition vers la ménopause débute au moment de la dernière période menstruelle, à laquelle succède la ménopause comme telle, qui dure jusqu'au décès.

### 1.2.2 Biologie des œstrogènes

Les stéroïdes sexuels sont des hormones habituellement connues pour leur rôle joué dans le développement des caractères sexuels; tant primaires (développement des appareils reproductifs) que secondaires (différentiation sexuelle). Plus souvent qu'autrement, deux principales catégories de stéroïdes sexuels sont reconnues : les androgènes (essentiellement « mâles ») et les œstrogènes (essentiellement « femelles », s'écrivant également « œstrogènes »). Ces derniers exercent leurs effets physiologiques dans une grande variété de tissus par le biais de leur liaison avec les récepteurs intracellulaires à œstrogène (dont ER $\alpha$  et ER $\beta$ ). Trois œstrogènes majeurs sont naturellement produits chez la femme : l'estrone (ou E1), l'œstradiol (ou œstradiol ou E2) et l'œstriol (ou E3). L'œstradiol (également souvent appelée « œstradiol » ou « 17 $\beta$ -œstradiol ») constitue le plus important des œstrogènes chez les femmes adultes. Chez les femmes pré-ménopausées, les œstrogènes dont la 17 $\beta$ -œstradiol sont essentiellement synthétisés par les ovaires à un degré variable lors du cycle menstruel. Les glandes surrénales et le tissu adipeux apportent également une contribution mineure à la synthèse des œstrogènes. Les hommes adultes, qui n'ont pas d'ovaire, produisent également la 17 $\beta$ -œstradiol, mais à un degré beaucoup moindre que les femmes adultes pré-ménopausées. Durant le cycle menstruel normal [13] chez la femme adulte pré-ménopausée, les concentrations sanguines d'œstradiol sont d'environ 50 pg/mL au début de la menstruation, atteignent environ 200 pg/mL à

la phase folliculaire, chutent brièvement à environ 70 pg/mL pendant l'ovulation et plafonnent à environ 140 pg/mL lors de la phase lutéale pour finalement retomber aux mêmes niveaux que la phase menstruelle (à moins d'une grossesse). La dégradation des follicules ovariens sous-jacente à la péri-ménopause occasionne un déclin graduel de production de  $17\beta$ -estradiol. Avec la ménopause, la conversion de la testostérone (le principal stéroïde androgène de l'organisme) en  $17\beta$ -estradiol via l'enzyme aromatasase au niveau surrénal ainsi que de l'androsténédione (un précurseur de la testostérone) en oestrone dans le tissu adipeux, deviennent les principales sources d'œstrogènes. À terme, l'estrone (un œstrogène relativement inactif par rapport à l'oestradiol) remplace la  $17\beta$ -oestradiol comme principal œstrogène chez les femmes post-ménopausées [14]. En effet, les concentrations sanguines d'estradiol et d'estrone avoisinent 14 pg/mL et 30 pg/mL respectivement à la ménopause [13].

### 1.3 Homéostasie du glucose et diabète de type 2

L'organisme en santé doit pouvoir maintenir sa glycémie (le taux de glucose sanguin) à un niveau optimal, sans égard à l'alimentation ou aux conditions externes [15]. Ce processus, décrit comme étant l'homéostasie du glucose, met en jeu une complexe interaction entre plusieurs tissus [16]. Ces tissus comprennent le foie, le muscle squelettique, le tissu adipeux, le cerveau et le pancréas [16-18]. Lorsque l'organisme est à jeûn, l'insulinémie (la concentration sanguine d'insuline) est relativement basse en raison du faible taux de glucose dans le sang [18, 19]. Dans cette situation, les principales hormones favorisant une élévation de la glycémie (la concentration sanguine de glucose) soit le glucagon, l'adrénaline et le cortisol sont libérées, ce qui a pour effet de favoriser la production hépatique de glucose [20, 21]. À l'opposé quand l'organisme se trouve dans un état post-prandial (suivant l'ingestion d'un repas), la sécrétion d'insuline par les îlots pancréatiques augmente de façon importante en réponse à un apport de glucose ainsi que d'acides aminés (ex. : arginine) dans le système digestif, puis dans la circulation sanguine [17, 19, 21, 22]. Seule hormone de l'organisme en mesure de faire diminuer la glycémie [23], l'insuline promeut l'entrée ainsi que le stockage du glucose sous forme de glycogène à l'intérieur des cellules du

muscle squelettique ainsi que les cellules adipeuses [24-26]. L'insuline empêche également la production hépatique de glucose en inhibant la glycogénolyse (la dégradation du glycogène en glucose) et la gluconéogenèse (la synthèse de glucose à partir d'autres composés) [18, 26].

Si l'organisme ne répond pas de manière adéquate en termes de sécrétion et/ou d'action des hormones mentionnées ci-haut, le contrôle de la glycémie peut se retrouver compromis et celle-ci risque alors d'augmenter de façon importante. L'insulino-résistance se caractérise par une insensibilité des tissus à l'action de l'insuline; alors qu'une diminution de la capacité des cellules  $\beta$  du pancréas à sécréter l'insuline de façon aigüe en réponse à une élévation aigüe de la glycémie caractérise l'intolérance au glucose. L'insulino-résistance ainsi que l'intolérance au glucose témoignent d'un état pré-diabétique [27, 28]. La glycémie restera relativement bien maintenue aussi longtemps que le pancréas pourra compenser cette perte de sensibilité à l'insuline par une sécrétion d'insuline plus élevée (en partie grâce à une hypertrophie des îlots pancréatiques). Ultiment, si l'insulino-résistance persiste ou s'amplifie, le fardeau auquel sont soumises les cellules  $\beta$ -pancréatiques productrices d'insuline va provoquer un épuisement de celles-ci (lire la section 1.5 pour plus de détails). Il y aura dès lors apparition d'hyperglycémie (lire le paragraphe suivant pour plus de détails). C'est l'état diabétique. Les mécanismes cellulaires exacts responsables de cette progression vers le diabète ne sont pas encore très bien connus. Entre autres facteurs, des anomalies dans la voie de signalisation moléculaire de l'insuline, dans le transport et le métabolisme tissulaires du glucose ainsi que dans la fonction pancréatique sont mis en cause.

Le diagnostic du diabète reposant en grande partie sur l'évaluation de la glycémie, le dépistage précoce du diabète s'avère donc crucial à un pronostic favorable. Cliniquement parlant, un diagnostic du DT2 est établi lorsque la glycémie journalière dépasse les 200 mg/dl (11,1 mmol/l); le tout en présence de symptômes tels que la

polyurie (urination excessive), la polydipsie (soif excessive) et une perte de poids inexpliquée [29, 30]. D'ailleurs, le DT2 peut être diagnostiqué lorsque la glycémie à jeûn (d'au moins 8 heures) excède les 126 mg/dl ( $>7,0$  mmol/l) [29]. Une glycémie à jeûn comprise entre 6,1 et 7,0 mmol/l peut être un signe de résistance à l'insuline [23, 29-31]. Par ailleurs, le test de tolérance au glucose (OGTT, *oral glucose tolerance test*) constitue l'outil de diagnostic du DT2 par excellence [29]. L'OGTT consiste à administrer oralement une dose (bolus) de glucose à jeûn (correspondant à 75 g) [29]. Chez le sujet sain, dont l'insuline agit efficacement, la glycémie augmente d'abord pour ensuite se rétablir à des valeurs normales en l'espace de deux heures. Pour sa part, le sujet diabétique voit sa glycémie augmenter davantage suite à l'ingestion de glucose tout en demeurant très élevée à la fin du test. Une glycémie supérieure à 200 mg/dl (11,1 mmol/l) 120 minutes après l'ingestion de glucose est considérée problématique [29, 30].

#### 1.4 Homéostasie musculaire du glucose

Produite par les cellules  $\beta$  du pancréas, l'insuline est extrêmement importante pour le bilan énergétique, la régulation métabolique des glucides, lipides ainsi que des protéines dans le muscle squelettique, le tissu adipeux et le foie. De plus, l'insuline est la plus importante hormone impliquée dans le maintien d'une glycémie adéquate. Dans le tissu adipeux ainsi que le muscle squelettique, l'insuline stimule le transport du glucose de la circulation sanguine vers l'intérieur de ces tissus en induisant l'expression et la translocation d'une protéine appelée le transporteur du glucose 4 (GLUT4) par le biais d'une importante voie métabolique : la voie de signalisation de l'insuline. Le transporteur GLUT4 est le seul isoforme de la famille des GLUTs à répondre à l'insuline et constitue l'étape limitante du transport du glucose. Durant la phase post-prandiale, la glycémie est élevée, ce qui suscite la sécrétion d'insuline pour favoriser le transport tissulaire du glucose, avec pour effet de ramener la glycémie à la normale. Dans la mesure où 75-85% du transport cellulaire du glucose dans l'organisme se joue au niveau du muscle squelettique [18, 24], l'étude de ce tissu revêt une importance particulière. De plus, le transport du glucose dans le

muscle squelettique est limitant pour le transport du glucose dans tout l'organisme. Comme l'illustrent bien la Figure 1 et la Figure 2, toute défaillance dans une partie ou une autre du processus décrit ci-haut (induction/signalisation de la voie de l'insuline, expression ou translocation de GLUT4) ainsi que du métabolisme musculaire du glucose (stockage ou utilisation comme substrat énergétique) peut résulter en une résistance à l'insuline. L'insulino-résistance au niveau du muscle est d'ailleurs souvent considérée comme la principale défaillance de l'homéostasie dans la pathogénèse du DT2 [24].

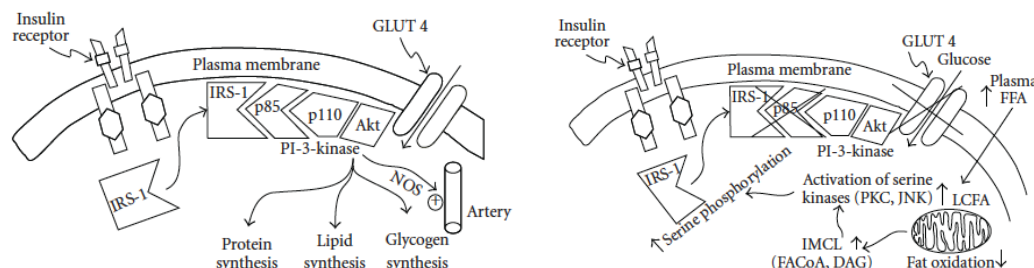


Figure 1 : Comparaison de la signalisation de la voie de l'insuline entre le muscle normal (à gauche) et le muscle insulino-résistant (à droite). Adapté de [25].

Insulin signaling	(1) Reduced insulin receptor tyrosine phosphorylation (2) Decreased IRS-1 tyrosine phosphorylation (3) Decreased PI3-kinase activation
Glucose transport	(1) Impaired GLUT4 translocation (2) Impaired GLUT 12 translocation
Glucose metabolism	(1) Decreased glucose phosphorylation (2) Decreased glucose oxidation and glycolytic FLUX (3) Impaired glycogen synthase

Figure 2 : Tableau résumant les principales dysfonctions de l'homéostasie musculaire du glucose en situation d'insulino-résistance. Adapté de [25].

Le glucose est incapable de diffuser passivement par lui-même vers l'intérieur d'une cellule. La protéine GLUT4 s'impose donc comme le principal véhicule ainsi que la principale étape limitante du transport cellulaire du glucose stimulé par l'insuline dans le muscle et les adipocytes. En se liant à son récepteur spécifique sur le muscle squelettique, l'IR (*insulin receptor*), l'insuline suscite plusieurs réponses biologiques dont le transport cellulaire du glucose dans le muscle squelettique par GLUT4. En effet, le récepteur ainsi activé par le signal insulinémique stimule à son tour plusieurs voies d'activation intracellulaires. Ces voies sont normalement régulées par une multitude de signaux métaboliques (ex.: anabolisme vs catabolisme), moléculaires (ex.: neurotransmetteurs, hormones) et physiologiques (ex.: état de jeûne vs état post-prandial, état au repos vs à l'effort). L'équilibre entre ces différents signaux détermine la réponse spécifique de la cellule à l'insuline. La voie PI3K-PDK-Akt (Figure 1) compte parmi les voies de signalisation moléculaires les plus étudiées. Cette voie s'enchaîne en une cascade de phosphorylations (activation par des kinases) et de déphosphorylations (désactivation par des phosphatases) successives [20]. Dans un premier temps, le récepteur IR (déjà activé) s'autophosphoryle et active ses substrats IRS-1 et IRS-2 [20]. La phosphorylation de IRS-1 ainsi que son association à l'unité régulatrice p85 de PI3-K activent ensuite l'unité catalytique p110 de ce même PI3-K. Cette activation de PI3-K résulte en une formation accrue des phosphoinositides intracellulaires tels que IP<sub>3</sub> [20]. À leur tour, les phosphoinositides activent la PDK ainsi que la PKB/Akt et/ou la [20]. L'activation du substrat AS160 de l'Akt permet ensuite la translocation de GLUT4 du cytosol vers la membrane plasmique afin de faciliter le transport du glucose à l'intérieur de la cellule [20]. Le glucose peut alors soit être rapidement métabolisé pour produire de l'énergie (glycolyse), soit être constitué en réserve sous forme de glycogène (glycogénèse). De manière plus spécifique, le glucose est rapidement phosphorylé par les hexokinases parmi lesquelles l'hexokinase 2. Cette phosphorylation du glucose l'empêche de pouvoir sortir à nouveau de la cellule. Ainsi emprisonnée dans la cellule, le glucose peut alors servir de substrat métabolique à la production d'énergie via la production d'ATP ou être assemblé sous forme de glycogène pour fins de stockage. La 6-phosphofructokinase est l'enzyme la plus importante de la glycolyse car elle en

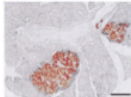
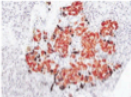
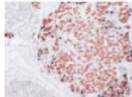
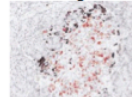
contrôle la principale étape limitante [32]. De son côté, le glycogène synthétase est la principale enzyme de la glycogénèse [33].

### 1.5 Homéostasie pancréatique du glucose

Le pancréas est un organe glandulaire du système digestif et endocrinien. Il s'agit d'une glande endocrine produisant des hormones importantes sur le plan physiologique telles que l'insuline, le glucagon, et la somatostatine. Le pancréas agit également comme une glande exocrine en sécrétant diverses enzymes digestives dans le petit intestin. Constituant 1-2% de la masse pancréatique, les îlots de Langerhans renferment entre 300 et 1000 cellules sécrétrices chacune. Ces cellules se divisent en 5 types: les cellules  $\alpha$  (sécrétant le glucagon),  $\beta$  (sécrétant l'insuline et l'amyline),  $\delta$  (sécrétant la somatostatine), PP (sécrétant le polypeptide pancréatique) et  $\epsilon$  (produisant la ghréline). Les cellules  $\beta$  constituent la majorité de la masse cellulaire totale des îlots de Langerhans, dans une proportion de 55% à 65% chez l'humain et de 60% à 80% chez les rongeurs [15, 34]. De plus, les cellules  $\beta$  des rongeurs se situent davantage dans le cœur de l'îlot alors que celles des humains sont distribuées plus également. Elles produisent et relâchent continuellement une certaine quantité d'insuline dans la circulation sanguine afin de contrôler la glycémie. Le taux de biosynthèse de l'insuline est contrôlé par plusieurs signaux moléculaires incluant : les neurotransmetteurs, les hormones et les nutriments, parmi lequel le glucose est le plus important.

D'une part, les sujets sains ont des cellules  $\beta$  qui sont en mesure de répondre rapidement à des élévations aiguës de la glycémie (dûes à un apport alimentaire en l'occurrence) en augmentant leur sécrétion d'insuline. D'autre part, la sécrétion d'insuline demeure chroniquement élevée chez les sujets insulino-résistants parce qu'il leur est continuellement nécessaire d'en sécréter davantage pour réussir à garder la glycémie sous contrôle. Cette situation d'hyper-insulinémie compensatoire se caractérise par une hyperactivité ainsi qu'une hypertrophie des cellules  $\beta$ . À force

d'être chroniquement sur-sollicitées de la sorte, les cellules  $\beta$  ne sont plus en mesure de répondre de façon aigüe à un apport glycémique ponctuel parce qu'elles finissent par « s'épuiser » (décompensation), phénomène souvent associé à leur atrophie. Les îlots de Langerhans qui les contiennent voient alors leur structure se désorganiser, la perte de l'intégrité structurelle des îlots allant de pair avec un déclin fonctionnel de ceux-ci (Tableau 1). L'insuline étant la seule hormone capable de faire diminuer la glycémie, plus rien ne peut alors empêcher la glycémie d'atteindre des niveaux dangereusement élevés pour l'organisme; il s'agit du début d'un DT2. En égard à la physiopathologie du DT2, certains facteurs tels que la prédisposition génétique, la glucotoxicité, la lipotoxicité, l'inflammation ainsi que plusieurs autres affectent masse et fonction pancréatiques. Par exemple, il est bien connu que l'accumulation chronique de lipides au niveau pancréatique interfère avec la sensibilité des cellules  $\beta$  au stimulus glucidique ainsi qu'avec sa capacité à sécréter l'insuline, contribuant ainsi à leur désorganisation.

	<b>Normal</b>	<b>Intolérance au glucose</b>	<b>Diabète type 2 (début)</b>	<b>Diabète type 2 (avancé)</b>
<b>Événement</b>	—	Développement de l'insulino-résistance et Compensation du pancréas	Décompensation du pancréas (début)	Décompensation du pancréas (avancée)
<b>Morphologie des îlots de Langerhans</b>	Normale 	Hypertrophie 	Hypertrophie maximale 	Atrophie et désintégration 
<b>Sensibilité à l'insuline</b>	Normale	Légèrement diminuée	Diminuée	Diminuée
<b>Sécrétion d'insuline</b>	Normale	Élevée	Diminuée	Très diminuée
<b>Glycémie</b>	Normale : < 6,1 mmol	« Normale » : Entre 6,1 mmol et 7,0 mmol	Augmentée : >7,0 mmol	Très augmentée : >>7,0 mmol

*Tableau 1: Tableau résumant l'évolution physiopathologique vers le DT2 de l'homéostasie pancréatique du glucose.*



## **2 Projet d'étude : les effets de l'ovariectomie et de l'activité physique sur l'homéostasie du glucose chez les rates ZDF**

### 2.1 Objectifs

Comme il a été mentionné au début du présent mémoire, il peut être légitime de se demander si la perte de production ovarienne d'œstrogènes survenant à la ménopause peut précipiter la pathogénèse du DT2 chez les femmes. De même, on peut également se demander si les nombreux bienfaits de l'activité physique déjà bien documentés pour la population en général continuent d'exister dans un contexte de déficience en œstrogènes chez les femmes. Pour tenter d'obtenir des éléments de réponse, nous avons décidé d'étudier, dans un contexte de pathogénèse de DT2, les effets de 1) l'ablation chirurgicale des ovaires (ovariectomie) et 2) de l'entraînement volontaire à la course suite à l'ovariectomie sur l'homéostasie du glucose de rats ZDF (Zucker diabétiques et obèses) femelles, un modèle animal de DT2. Pour atteindre les deux objectifs de l'étude, les parties 3 et 4 du présent ouvrage seront consacrées à tenter de répondre aux deux questions soulevées au plus haut. À la partie 5 se trouve un manuscrit de l'article (présentement en préparation) de l'étude *Physical activity protects against withdrawal of estrogen protection on glucose homeostasis in ZDF rats*, effectuée dans le cadre du présent projet de maîtrise. Les parties 6 et 7 constituent respectivement une discussion générale sur l'étude et la conclusion du mémoire.

### 2.2 Modèle animal : la rate ZDF

Peu d'informations existent à savoir comment un retrait des estrogènes ovariens et l'activité physique peuvent influencer l'homéostasie du glucose chez des sujets animaux insulino-résistants. Récemment, Lundholm et al. [35] avaient observé que l'activation du récepteur à estrogène ER $\alpha$  améliora la tolérance au glucose de souris ob/ob (obèses et insulino-résistantes) ovariectomisées. Bien que cela nous soit instructif en regard du rôle possiblement joué par les estrogènes dans l'homéostasie du glucose chez la souris insulino-résistante, la question du rôle de l'activité physique

n'y fut pas abordée. Les souris ob/ob étant extrêmement obèses, l'entraînement physique de celle-ci s'avère très difficile et peu d'effets physiologiques de l'exercice sont rapportés chez cette souche de souris [36]. En ce qui concerne les rats jusqu'à présent, l'essentiel des études portant sur les effets de l'ovariectomie ainsi que de l'activité physique sur l'homéostasie du glucose chez les rats femelles en situation d'insulino-résistance ou d'obésité furent effectuées en utilisant des variétés Wistar et Sprague-Dawley. Par exemple, Saengsirisuwan et al. [37] ont étudié les altérations du métabolisme glucidique et lipidique suite à l'ovariectomie et à une programme d'entraînement en course sur tapis roulant chez des rates Sprague-Dawley. Plus récemment [38], les effets combinés de l'entraînement sur tapis roulant et d'un traitement à l'estradiol furent étudiés sur des rates Wistar obèses ovariectomisées. S'il est vrai que lors de ces études, les diètes très riches en lipides données à ces rates finissent généralement par les rendre obèses, intolérantes au glucose et/ou insulino-résistantes, les rates Wistar et Sprague-Dawley ne développent pas le DT2 pour autant. Autrement dit, ces modèles animaux ne conviennent pas à l'étude du rôle des oestrogènes dans la pathogénèse du T2D parce que les rates Sprague-Dawley et Wistar deviennent insulino-résistantes mais non hyperglycémiques avec une diète riche en lipides et ce, avec ou sans oestrogènes. Par ailleurs, il existe bien la possibilité d'effectuer des études avec des rates Sprague-Dawley ou Wistar rendues diabétiques par un traitement à la streptozotocine (STZ). Cependant, l'administration de cette dernière génère un diabète de type 1 (insulino-dépendant) plutôt qu'un diabète de type 2 (insulino-résistant) étant donné que cet agent pharmacologique agit en détruisant spécifiquement les cellules  $\beta$  du pancréas [39-42]. Conséquemment, le choix du modèle animal s'est arrêté sur les rates ZDF (Zucker diabétiques et obèses) femelles pour l'étude.

Le rat ZDF est un modèle animal fort utilisé dans le cadre d'études sur le DT2 et ses complications [43]. Le DT2 qui caractérise cette variété de rat repose sur une intolérance au glucose et une insulino-résistance causées par la suppression génétique du récepteur de la leptine [43] ainsi que par une mutation au niveau d'un promoteur

de l'insuline [44]. Les rats ZDF mâles et femelles sont naturellement insulino-résistants. Par contre, seuls les mâles commenceront à développer une hyperglycémie caractéristique du DT2 sous une diète normale, généralement à partir de l'âge de 7 semaines jusque vers l'âge de 10-12 semaines. Pour leur part, les femelles deviendront diabétiques seulement si elles sont exposées à un régime alimentaire particulier. Contrairement aux rats ZDF mâles, les rats ZDF femelles ont comme particularité de nécessiter une diète riche en lipides (Research Diets - D12468 ; 25.5% kcal en lipides) qui leur est spécialement attitrée selon les recommandations de la compagnie Charles River (le fournisseur des rats ZDF) afin de voir le DT2 se développer chez elles [45]. Cette particularité des rats ZDF femelles n'est pas sans évoquer l'observation empirique voulant que les femmes adultes non-ménopausées soient en quelque sorte souvent moins enclines à être aux prises avec le DT2 ou le SM que les hommes adultes du même âge ou encore les femmes post-ménopausées [46]. C'est ainsi qu'on est en droit de se demander si la protection éventuellement procurée aux rats ZDF femelles par les oestrogènes contre le développement du DT2 expliquerait leur moins grande susceptibilité à développer cette maladie que leurs congénères mâles.

### 2.3 Interventions : ovariectomie et entraînement volontaire

Pour vérifier le rôle présumé des œstrogènes dans un contexte de pathogénèse du DT2 chez les rates ZDF, nous avons souhaité étudier les effets d'un retrait des œstrogènes ovariens sur l'homéostasie du glucose. Pour ce faire, nous avons décidé de procéder à l'ovariectomie (le retrait chirurgical des ovaires) des rates ZDF à l'âge de 10 semaines. Ce faisant, la principale source de production d'œstrogènes de ces rates se trouve éliminée au moment attendu de transition vers l'état diabétique. L'ovariectomie constitue un modèle animal fort bien établi de ménopause dans le domaine de la recherche sur le vieillissement [47]. En effet, l'ovariectomie chez les rongeurs est analogue à la ménopause chirurgicalement induite chez les femmes (ex.: hystérectomie) et permet de mettre en lumière l'influence des œstrogènes sur nombre de paramètres et réponses biologiques, physiologiques et métaboliques [47]. Pour ce

qui est de l'étude des effets de l'activité physique sur l'homéostasie du glucose des rates ZDF ovariectomisées, nous avons décidé de les inscrire à un programme d'entraînement volontaire à la course dans une cage à roue aussitôt que possible après l'ovariectomie. Nous estimons que contrairement à l'entraînement forcé, l'entraînement volontaire est plus « naturel » de part sa spontanéité et reproduit plus fidèlement les patrons d'activité physique généralement observés chez l'humain et chez l'animal [48].

#### 2.4 Implication personnelle dans le projet

En qualité de candidat à la maîtrise, il m'incombait personnellement d'assurer la bonne marche du présent projet d'étude ainsi que son aboutissement à terme. Mes rôles et responsabilités étaient multiples :

- Organisation, gestion et traitement des données de l'hébergement des animaux lors de la phase expérimentale
- Organisation, gestion et exécution des sacrifices animaux; gestion des tissus prélevés
- Exécution des analyses biochimiques et moléculaires des tissus obtenus lors du sacrifice animal
- Traitement et analyse des données, rédaction et mise en forme de l'article
- Communication et présentation scientifiques des résultats de l'étude

Je suis le principal auteur de l'article ci-joint au mémoire. Mais plus souvent qu'autrement, la recherche scientifique est le fruit d'un travail collectif, et ce projet ne fit pas exception. Ainsi, j'ai pu compter sur un apport technique et scientifique des collaborateurs figurant comme co-auteurs sur l'article. Isabelle Côté, la seconde auteure, pratiqua personnellement les ovariectomies (pour lesquelles elle a une grande expérience) sur les rates ZDF et eu une influence sur la détermination de la durée de la phase expérimentale. La troisième auteure, Émilienne Tudor Ngo Sock, a

effectué une bonne partie des prélèvements sanguins sur les rates lors de la phase expérimentale. De plus, elle prit activement part au prélèvement des tissus lors du sacrifice des animaux. Jean-Marc-Lavoie, le quatrième auteur, fut l'instigateur de l'étude en tant que membre sénior du groupe MONET-SOMET (un groupe de recherche axé sur la santé métabolique des femmes). Ses conseils et ses ressources me furent également d'une grande aide pour l'avancement du projet dans son ensemble. Pour terminer, Raynald Bergeron figure comme dernier auteur en qualité de directeur de recherche. Il a assuré mon encadrement scientifique et technique toute la durée de l'étude, et même au-delà.

### 3 La ménopause peut-elle précipiter la pathogénèse du diabète de type 2 ?

#### 3.1 Rôle des œstrogènes dans l'homéostasie du glucose

Les œstrogènes sont d'importants régulateurs de l'homéostasie du glucose et des lipides, outre leurs rôles essentiels dans la fonction reproductrice (Figure 3; [49]). En effet, les œstrogènes agissent sur leurs récepteurs spécifiques majeurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  présents au niveau de plusieurs tissus importants dans l'homéostasie du glucose; le muscle squelettique, le tissu adipeux, le foie, le pancréas ainsi que le système nerveux central (Figure 4; [50]). Comme l'illustre la Figure 4, ER $\alpha$  semble médier principalement les effets bénéfiques des œstrogènes sur l'homéostasie du glucose tels que leur action anti-lipogénique, l'augmentation de la sensibilité à l'insuline, l'augmentation de la tolérance au glucose et l'amélioration de la composition corporelle [49-51]. Par exemple, l'activation de ER $\alpha$  prévient la stéatose hépatique et améliore l'insulino-sensibilité hépatique; améliore l'oxydation lipidique, l'expression de GLUT4 et la sensibilité à l'insuline au niveau du muscle squelettique; améliore la distribution du tissu adipeux tout en diminuant la masse adipeuse totale en diminuant sa captation d'acides gras circulants ainsi qu'en augmentant la lipolyse. Pour sa part, l'activation de ER $\beta$  a des effets contradictoires sur l'homéostasie du glucose. L'activation d'ER $\beta$  semble favoriser une diminution de la prise alimentaire ainsi qu'une augmentation de la dépense énergétique au niveau du système nerveux central, une diminution de l'accumulation lipidique, de l'adipogénèse ainsi que de la masse du tissu adipeux blanc; une amélioration de la fonction pancréatique; mais une diminution de la sensibilité à l'insuline et de l'expression de GLUT4 au niveau musculaire [49-51]. De plus, l'activation de ces deux récepteurs à estrogène a un effet positif sur la fonction pancréatique [49-51]. Dans de récentes études [52-55], il a été observé que l'activation des récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  favorisait l'intégrité cellulaire des cellules  $\beta$ -pancréatiques (en combattant les lésions pro-apoptotiques ainsi que la lipotoxicité) tout en améliorant leur réponse insulinémique au glucose. Il est à noter que les actions physiologiques de l'estradiol dépendent de plusieurs facteurs : 1) la présence des récepteurs ER $\alpha$  et/ou de ER $\beta$  sur le tissu concerné 2) la co-expression ou non de ces deux récepteurs dans les cellules 3) la modulation par ER $\beta$  de l'expression

génique médiée par ER $\alpha$  4) l'interaction entre les ERs et les facteurs de transcription 5) la présence de co-activateurs et de co-répresseurs [49, 50]. Ainsi, les œstrogènes et l'activation des récepteurs spécifiques ER $\alpha$  et ER $\beta$  exercent des effets multiples et principalement bénéfiques sur le métabolisme glucidique et lipidique.

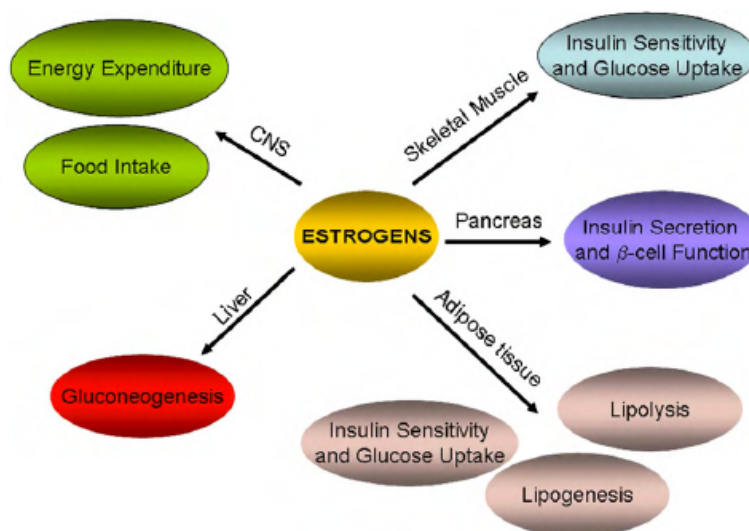


Figure 3 : Schéma illustrant les rôles métaboliques principaux des œstrogènes au niveau du muscle squelettique, pancréas, tissu adipeux, foie et système nerveux central. Adapté de [49].

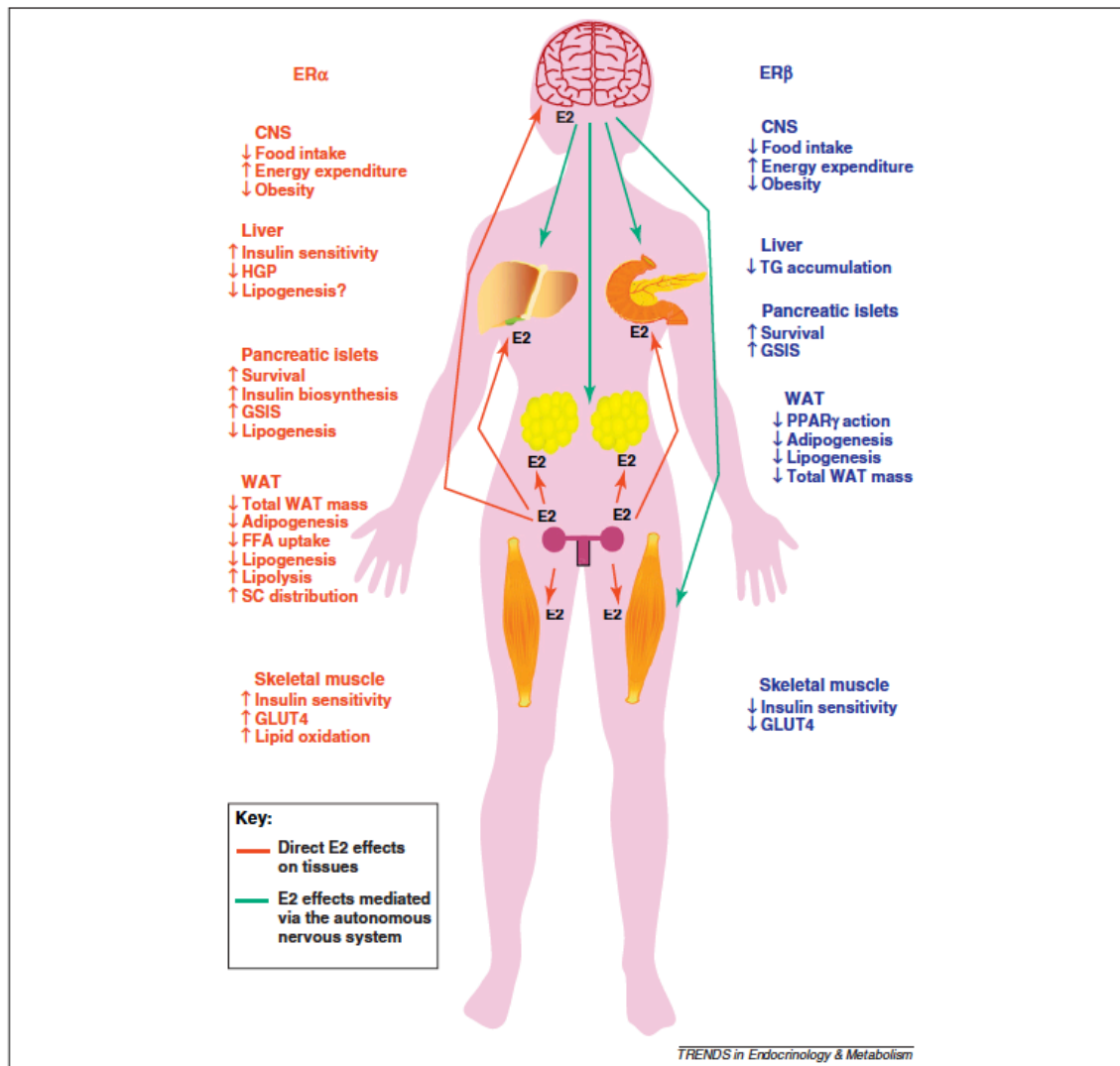


Figure 4 : Schéma illustrant les principaux effets métaboliques de l'activation des récepteurs d'œstrogènes  $\alpha$  et  $\beta$  par l'oestradiol (E2) au niveau du muscle squelettique, pancréas, tissu adipeux, foie et système nerveux central. Adapté de [50].

### 3.2 Obésité, insulino-résistance et diabète de type 2

L'obésité augmente le risque de MCV via la résistance à l'insuline, le DT2, l'hypertension artérielle et la dyslipidémie [14]. Au niveau du muscle squelettique, les sujets obèses intolérants au glucose démontrent une résistance à l'insuline comparativement à des individus non-obèses de même âge et de même sexe. La



sévérité de la résistance musculaire à l'insuline est directement reliée à l'augmentation de l'indice de masse corporelle (IMC), lié la plupart du temps à un pourcentage élevé de gras. En effet, les individus obèses ayant un pourcentage élevé de gras sont souvent aux prises avec la résistance à l'insuline [14]. Ainsi, tant les études animales que les études humaines démontrent qu'un gain de poids exacerbe l'insulino-résistance dans le muscle squelettique [24]. À l'inverse, la perte de poids chez les individus obèses intolérants au glucose améliore la sensibilité musculaire à l'insuline [4]. Étant donné les changements de composition corporelle associés à l'arrivée de la ménopause chez les femmes âgées [4, 5], il y a matière à penser que cela peut exacerber les anomalies métaboliques à la base de l'insulino-résistance et du DT2 dans cette population. L'effet négatif de la ménopause sur la composition corporelle est aussi bien documenté dans les modèles animaux qu'humains [14].

Nombre de femmes post-ménopausées sont aux prises avec le DT2; il existe toutefois peu d'information sur la façon dont les changements associés à la ménopause en affectent la physiopathologie. Même si le gain de poids corporel associé à la ménopause est largement attribuable au vieillissement normal plutôt qu'à la ménopause elle-même, des changements de composition corporelle ont été associés avec la ménopause de façon indépendante [14]. Ces changements de composition corporelle sont eux-mêmes associés à des altérations de la sensibilité à l'insuline et du métabolisme du glucose chez les femmes post-ménopausées [14]. Un gain excessif de poids en début d'âge adulte peut mener au développement de l'hyper-insulinémie chez les femmes génétiquement prédisposées à l'insulino-résistance [14]. Chez les femmes pré-ménopausées, l'hyper-insulinémie est reliée une obésité globale alors qu'elle est plutôt reliée à l'obésité viscérale abdominale chez les femmes post-ménopausées [56]. Comme ces différences de composition corporelle sont également d'importants prédicteurs de risques de SM et de DT2, les changements survenant à la ménopause pourraient se révéler cliniquement importants.

Des études transversales démontrent que les femmes post-ménopausées ont une plus grande masse adipeuse, davantage de gras viscéral abdominal ainsi qu'une plus faible masse maigre comparativement aux femmes pré-ménopausées, indépendamment de l'âge [4]. Ces données ne sont pas unanimes, une étude longitudinale n'a trouvé aucune association entre le fait d'être ménopausée et le tour de taille ou encore le ratio taille-cuisse, après ajustements pour l'âge et la pratique d'activité physique [4]. Par contre, une autre étude longitudinale suggère que des changements dans les niveaux d'hormone folliculo-stimulante sont associés à des changements de masse adipeuse, de circonférence de taille et de masse maigre dans le temps, indépendamment de l'âge [57]. Ces données suggèrent que le vieillissement ovarien pourrait être directement relié aux changements de composition corporelle entourant la ménopause, mais de plus amples recherches seront nécessaires pour clarifier cette relation [4]. D'ailleurs, plusieurs études ont suggéré que la relation bien établie entre l'obésité viscérale abdominale et la résistance à l'insuline dans la population générale se vérifie également pour les femmes post-ménopausées [4]. En effet, le tissu adipeux est surtout de nature sous-cutanée (sous la surface de la peau) chez les femmes pré-ménopausées alors qu'il devient plutôt viscéral (intra-abdominal) avec la venue de la ménopause [14, 58, 59]. Or, des associations indépendantes entre l'obésité viscérale abdominale et des altérations de la sensibilité à l'insuline ainsi que de la tolérance au glucose ont été également démontrées chez les femmes post-ménopausées [4, 60].

Même si une certaine controverse persiste quant à l'influence de la ménopause sur le risque de DT2 médié par les changements de la composition corporelle, il est possible que la diminution de production d'œstrogènes puisse quand même occasionner une aggravation de la physiopathologie du DT2. La HRT (thérapie de remplacement hormonal) constitue un cas de figure intéressant à cet égard. Cette thérapie consiste à administrer des œstrogènes exogènes en guise de remplacement pour les œstrogènes endogènes déficients. Sur le plan de la composition corporelle, les études se penchant sur la relation entre la HRT et les changements de composition corporelle ont produit des résultats variables. Alors que certaines études n'ont établi aucune relation entre

l'utilisation post-ménopausale de l'hormonothérapie et diverses mesures de la composition corporelle et de distribution de la masse adipeuse [61], d'autres études rapportent des effets bénéfiques de la thérapie hormonale sur le poids corporel, le gras viscéral, le ratio taille-cuisse et la masse maigre [14, 58, 59]. Le remplacement thérapeutique d'œstrogènes semble donc avoir un effet neutre ou bénéfique sur les changements négatifs de composition corporelle associés à la ménopause [4]. Toutefois, pour ce qui est de la pathogénèse du DT2 comme telle, les données issues de plusieurs grandes études cliniques suggèrent que la HRT diminue le risque de DT2 chez les femmes post-ménopausées, diminue la glycémie et augmente la sensibilité systémique à l'insuline [62-65]. De même, plusieurs études suggèrent que la HRT a un effet neutre ou bénéfique sur les femmes post-ménopausées souffrant de DT2 [66]. D'un autre côté, Pirimoglu et al. [67] ont récemment constaté qu'une hystérectomie pratiquée sur des femmes pré-ménopausées affectait négativement l'homéostasie du glucose. Les résultats de l'OGTT montraient une augmentation significative de la glycémie et de l'insulinémie 3 à 12 mois suite à l'opération par rapport aux valeurs d'avant l'opération [67]. De plus, dix-sept des trente femmes opérées ont eu un diagnostic d'intolérance au glucose ou de DT2 dans les 12 mois suivant l'opération [67]. Le ou les mécanismes exacts par lesquels les œstrogènes influencent la sensibilité à l'insuline ainsi que l'homéostasie du glucose sont toutefois encore mal compris. À l'instar des femmes post-ménopausées, dont les niveaux d'œstrogènes sont faibles, il est également intéressant de constater l'influence des œstrogènes sur l'homéostasie du glucose chez les hommes. En fait, les hommes présentant une absence du récepteur d'estrogènes ER $\alpha$  ainsi que de l'enzyme aromatase (enzyme responsable de la conversion d'une partie de la testostérone en oestradiol) ont un métabolisme du glucose diminué et sont insulino-résistants [50, 68]. Il est par ailleurs démontré que le polymorphisme génétique du gène ER $\alpha$  est associé avec le DT2 et le syndrome métabolique chez l'humain [69].

Plusieurs modèles animaux reproduisant la ménopause humaine ont été utilisés pour en étudier les effets sur la physiopathologie du DT2. Chez les souris ArKO par

exemple (dont l'enzyme aromatasase est inactivée, donc incapable de produire de l'estradiol), l'importance de l'estradiol dans l'homéostasie du glucose fut décrite. Les souris ArKO mâles et femelles développent la résistance à l'insuline et ont une oxydation réduite du glucose, une adiposité augmentée et une insulïnémie assez élevée pour mener au DT2 à long terme [70]. Les souris ER $\alpha$ -déficientes (mâles et femelles) développent de l'obésité et l'insulino-résistance [71], mais pas d'hyperphagie. Par contre, leur prise alimentaire et leurs poids corporels diminuent alors qu'augmente leur dépense énergétique lorsque de l'oestradiol leur est administrée [50]. L'administration d'estradiol chez les souris obèses ob/ob ovariectomisées améliore la tolérance au glucose et augmente la sensibilité à l'insuline [35], ces mêmes constatations ont été faites chez les souris ob/ob traitées au PPT (propylpyrazole triol), un agent pharmacologique agoniste de ER $\alpha$  [35]. L'administration chronique d'estradiol, d'agents pharmacologiques agonistes d'ER $\alpha$  et de phyto-œstrogènes chez les souris soumises à une diète riche en lipides donne également des résultats semblables. Outre les souris ArKO et ER $\alpha$ -déficientes, les rates Wistar et Sprague-Dawley ovariectomisées, ont également été utilisées comme modèles pour étudier les effets physiologiques et métaboliques d'une déficience en hormones ovariennes [37, 38]. Il est bien établi que l'ovariectomie occasionne chez les rates une augmentation de la prise alimentaire, du poids corporel et de la masse adipeuse [14], même si les données concernant l'utilisation des substrats énergétiques suite à l'ovariectomie restent contradictoires. De plus, l'ovariectomie chez les rates occasionne chez celles-ci une stagnation ou une diminution de la tolérance au glucose [37, 38]. L'administration d'oestradiol chez les rates ovariectomisées améliore la tolérance au glucose et augmente la sensibilité à l'insuline [37, 38].

L'ensemble des observations concernant les femmes post-ménopausées, la HRT, les modèles animaux de ménopause et même les hommes suggèrent que l'estradiol et l'ER $\alpha$  favorisent le maintien d'une composition corporelle saine et la sensibilité à l'insuline, tant chez les modèles animaux que chez les femmes. Par contre, certains suggèrent que des concentrations trop élevés d'estradiol peuvent cependant

occasionner la résistance à l'insuline et augmenter le risque de développer un DT2 [72, 73].

### 3.3 Homéostasie musculaire du glucose

Les données émanant des études animales suggèrent que le transport musculaire du glucose est négativement affecté par une perte de fonction des estrogènes. En effet, le transport insulino-dépendant du glucose dans le muscle squelettique est diminué chez les souris ovariectomisées [74] ainsi que chez les rates ovariectomisées [75]. L'administration d'estradiol chez les rates ovariectomisées améliore le transport musculaire du glucose ainsi que l'expression protéique de GLUT4 [37]. De même, chez les souris ER $\alpha$ KO (total), l'expression de GLUT4 dans le muscle squelettique est extrêmement réduite mais pas affectée chez les souris ER $\beta$ KO [51]. Les souris femelles ER $\alpha$ -déficientes voient leur niveau de lipides intramusculaires et de marqueurs d'inflammation augmenter de façon marquée dans le muscle favorisant ainsi la résistance à l'insuline dans ce tissu (Figure 5; [51]). De plus, il a récemment été montré que des cellules musculaires C2C12 stimulées par des doses physiologiques d'estradiol voyaient leur phosphorylation d'Akt et d'AMPK augmentées [76, 77]. Ces derniers résultats furent par la suite confirmés au niveau du muscle squelettique *ex vivo* chez le rat, nonobstant le transport du glucose [78].

Physiological Consequences of Whole Body ER $\alpha$  Deletion





 Pancreas	Hyperinsulinemia
 Skeletal Muscle	Insulin resistance Impaired oxidative metabolism Increased bioactive lipid intermediates Stress kinase activation and inflammation Impaired induction of HSP72 in response to HFD
 Liver	Insulin resistance Impaired glucose tolerance Increased circulating triglycerides and cholesterol Impaired induction of HSP72 in response to HFD
 Adipose Tissue	Insulin resistance Increased adipose mass Reduced adiponectin, increased leptin Increased MCP-1 and PAI-1 Impaired induction of HSP72 in response to HFD Reduced adipogenic marker expression in response to HFD

Figure 5 : Tableau illustrant les effets physiologiques de la suppression génétique de ER $\alpha$  au niveau pancréatique, musculaire, hépatique et adipeux. Adapté de [51].

Les données concernant la ménopause/ovariectomie et les enzymes glycolytiques sont pour leur part plutôt limitées. Ainsi, l'activité de plusieurs enzymes glycolytiques dont la phosphofruktokinase [79] et la glucose-6-phosphatase est diminuée dans l'endomètre et le myomètre de femmes post-ménopausées par rapport à celle des endomètres en phase proliférative ou pré-ménopausées [79-81]. Diverses études animales suggèrent une certaine influence des œstrogènes sur le métabolisme du glucose. Par exemple, Singhal et al. [82] ont observé que l'activité de la plupart des enzymes glycolytiques utérins augmentait suite à une stimulation par œstrogène. Dans une étude plus récente de Shinkarenko [83], il fut observé que du tissu utérin (muscle lisse) immature stimulé *in vitro* à l'œstrogène augmentait sa consommation de glucose de 80%, sa production de lactate de 150 % et sa glycogénèse de 150%; témoignant ainsi d'une importante modification d'activité de métabolisme du glucose

dans ce tissu. Il est également intéressant de noter que la  $17\beta$ -estradiol stimule également la glycolyse et les enzymes qui y sont associées chez les cellules du cancer du sein [84, 85]. D'ailleurs, l'ovariectomie suscite une baisse de l'activité enzymatique des hexokinases dans le muscle cardiaque des rates Wistar-Kyoto [86] alors que l'administration de  $17\beta$ -estradiol augmente la biosynthèse des hexokinases 1 et 2 au niveau du muscle utérin [82, 87, 88] ainsi que leur activité quand l'estradiol est administrée chroniquement [89] chez des rates ovariectomisées. De la même manière, l'ovariectomie affecte négativement l'activité de la phosphofructokinase chez les rates alors que l'administration aiguë de  $17\beta$ -oestradiol la rétablit [90]. Finalement, l'expression protéique et l'activité de la glycogène synthétase du muscle squelettique sont diminuées par l'ovariectomie [75, 91], mais rétablies par l'administration d'estradiol [91].

#### 3.4 Homéostasie pancréatique du glucose

Les œstrogènes jouent un rôle dans la régulation de la fonction pancréatique. Sans négliger le récepteur GPR30/GPER, les récepteurs d'œstrogène  $ER\alpha$  et  $ER\beta$  constituent le principal lien entre les œstrogènes et la fonction pancréatique. L'estradiol et le récepteur d'œstrogène  $ER\alpha$  influencent positivement la sécrétion d'insuline et protègent les cellules  $\beta$  de l'apoptose induite par lésion [92, 93]. Cela se fait aussi bien par une augmentation de la biosynthèse d'insuline que par la protection de l'intégrité cellulaire; des mécanismes utilisés par les îlots de Langerhans pour s'adapter à un état insulino-résistant. En effet, les effets cytoprotecteurs de l'oestradiol se trouvent contrecarrés par la suppression génique de  $ER\alpha$  chez les souris (Figure 5; [53]); les îlots pancréatiques de ces souris démontrent une légère hyperplasie.

En plus de l'effet aigu de l'oestradiol, il est depuis longtemps connu que celui-ci exerce une régulation à long terme de la biosynthèse de l'insuline [94]. En utilisant des souris génétiquement modifiées, il a été démontré que l'activation du récepteur

d'oestrogène ER $\alpha$  *in vivo* et *in vitro* régule le niveau pancréatique d'insuline à des concentrations physiologiques [52]. Avec l'augmentation de la biosynthèse de l'insuline, les îlots incubés en présence d'oestradiol présentaient une synthèse glucose-induite d'insuline augmentée [52, 95, 96].

Toutefois, les œstrogènes et le récepteur ER $\alpha$  n'influencent ni la division cellulaire des cellules  $\beta$ , ni leur masse en situation non-pathologique [52]. En effet, une récente étude portant sur les souris montre qu'une exposition à long-terme à l'oestradiol augmente le contenu des cellules  $\beta$  en insuline, l'expression génique de l'insuline et sa sécrétion sans changement de masse cellulaire [55]. L'oestradiol est donc un potentiel régulateur de la fonction des cellules  $\beta$ . Il faut néanmoins noter que l'action des œstrogènes au niveau pancréatique doit survenir à un moment et en quantité appropriés [54, 55]. Des niveaux supra- ou sous-physiologiques peuvent autrement causer divers effets négatifs tels que la résistance à l'insuline. Même si plusieurs aspects de cette réalité sont toujours sujets à débat, on pense qu'à des niveaux physiologiques, l'oestradiol potentialise la réponse insulinémique par l'activation de la protéine kinase cGMP-dépendante. L'oestradiol augmente la sécrétion glucose-dépendante d'insuline de façon aigüe lorsque présent à des concentrations physiologiques, aussi bien *in vitro* que *in vivo* [95, 97]. Il fut démontré que l'oestradiol déclenche la synthèse de cGMP, qui à son tour active la protéine kinase G (PKG). Les canaux potassiques ATP-dépendants ( $K_{ATP}$ ) se ferment alors de manière PKG-dépendante, causant ainsi la dépolarisation de la membrane et l'augmentation de la signalisation calcique glucose-induite [98].

### 3.5 Première hypothèse de travail

En résumé, les divers éléments discutés ci-haut permettent donc de penser que la privation en estrogènes ovariens par ovariectomie/ménopause ou une altération de leur fonction affecte négativement l'homéostasie du glucose, tant chez l'humain que chez l'animal. En gardant à l'esprit l'important rôle joué par les estrogènes dans



l'homéostasie du glucose, la détérioration de la composition corporelle ainsi que de l'homéostasie musculaire et pancréatique du glucose observées avec la perte d'estrogènes ont le potentiel d'exacerber la pathogénèse du DT2. C'est ainsi qu'on pouvait émettre une première hypothèse de travail selon laquelle une ovariectomie pratiquée sur des rats ZDF femelles (une souche dont la femelle peut développer le DT2 contrairement aux rates Sprague-Dawley et Wistar, moyennant une diète riche en lipides) perturberait leur homéostasie du glucose pour éventuellement précipiter le développement du DT2.

#### 4 L'activité physique peut-elle contrer les effets de la ménopause sur la pathogénèse du diabète de type 2 ?

Une majorité de femmes post-ménopausées est sédentaire. Comparé aux femmes pré-ménopausées, les femmes post-ménopausées sont plus enclines à un mode de vie sédentaire et au déconditionnement physique [6]. Un mode de vie sédentaire est clairement associé à un état de santé [7] et une qualité de vie moindres (Figure 6; [6, 7]). S'il existe assez peu d'informations quant à l'effet de la ménopause sur l'étiologie du DT2, il en existe encore moins au sujet du rôle potentiellement joué par l'activité physique dans un tel cas de figure. Or, il est bien établi que l'activité physique améliore la sensibilité corporelle à l'insuline ainsi que l'action de l'insuline sur le transport musculaire du glucose, tant chez les individus sains que chez les sujets rongeurs sains [99, 100]. De plus, nombre d'études démontrent clairement que l'entraînement en endurance est une intervention efficace qui mène à des améliorations du métabolisme du glucose insulino-dépendant, tant chez les modèles animaux de résistance à l'insuline que chez les humains ayant une intolérance au glucose [99, 100]. Toutefois, les bénéfices de l'entraînement sur l'action de l'insuline dans des conditions de perturbation métabolique causée par une privation prolongée en œstrogènes n'ont pas été investiguées de manière approfondie.



Figure 6 : Schéma illustrant un continuum des problèmes de santé associés au mode de vie sous-jacent à l'insulino-résistance. Source : Adapté de [60].

Il est cependant possible que l'activité physique continue d'être bénéfique en dépit de la perte d'œstrogènes parce que les effets de cette dernière semblent pouvoir se substituer partiellement à celle des œstrogènes. En effet, dans une étude de Lemoine

et al. [101], l'expression génétique de ER $\alpha$  fut augmentée à travers divers types de muscle squelettique (soléaire, gastrocnémus EDL) suite à un programme d'entraînement en endurance suivi par des rats Wistar femelles. De plus, cette modification de l'expression génétique semble être spécifique au type de muscle impliqué dans le protocole d'entraînement [101]. Comme il est élaboré dans la discussion de l'article ci-joint, il se peut alors que l'activité physique contribue à augmenter la sensibilité tissulaire aux œstrogènes et par le fait même les effets bénéfiques médiés par ER $\alpha$  sur l'homéostasie du glucose. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les hommes, dont la production endogène d'œstrogènes constitue normalement une fraction de celle observé chez les femmes pré-ménopausées [13], sont tout de même enclins à être insulino-résistants en présence de mutation génétique pour ER $\alpha$  [69] ainsi que d'une déficience en aromatase [68]. Or, il appert que les femmes post-ménopausées présentent des concentrations sanguines d'oestradiol comparables à celles d'hommes adultes [13]; laissant ainsi entrevoir la possibilité que même des quantités réduites d'estrogènes soient suffisantes à influencer positivement l'homéostasie du glucose.

#### 4.1 Obésité, insulino-résistance et diabète de type 2

Plusieurs études ont montré que les changements négatifs de composition corporelle entourant l'âge de la ménopause peuvent être atténués par une augmentation de l'activité physique [102, 103], ce qui souligne l'importance de la pratique de l'activité physique chez les femmes vieillissantes. Dans une étude prospective de cohorte par exemple [63], le risque relatif de DT2 a été diminué de 16 % chez des femmes âgées de 34 à 59 ans qui faisaient de l'exercice une fois par semaine. Parmi celles-ci, celles qui avaient perdu du poids ont vu leur risque relatif de DT2 chuter de 33%. L'activité physique peut donc directement atténuer les changements métaboliques associés à la ménopause. À cet effet, nombre d'études portant sur des femmes obèses post-ménopausées aux prises avec le DT2 démontrent que l'amélioration de la sensibilité à l'insuline induite par l'exercice a lieu indépendamment d'une amélioration de la composition corporelle et/ou du profil lipidique [104-106].

L'entraînement chez les animaux diminue la déposition adipeuse et augmente la sensibilité à l'insuline [37, 99]. Des études effectuées avec des rates ovariectomisées suggèrent que l'activité physique peut atténuer les marqueurs de l'insulino-résistance, avec [38, 107] ou sans [108] amélioration de la composition corporelle et/ou du profil lipidique. Dans la récente étude de Saengsirisuwan et al. [37], les animaux ovariectomisés avaient un plus grand poids corporel final, contenu en gras viscéral et niveaux de LDL ( $p < 0,05$ ) par rapport aux animaux sham (non ovariectomisés). L'entraînement et l'administration d'estradiol ont significativement réduit les poids corporels (de 6% et 25% respectivement), le gras viscéral (de 37% et 51% respectivement), et les LDL (de 19 et 26% respectivement). Également, l'entraînement seul avait augmenté la tolérance corporelle au glucose (de 29%), qui fut le plus augmenté chez les rates entraînées avec l'oestradiol (de 51%). La récente étude de Zoth et al. [38] portant sur des rates Wistar indique que l'ovariectomie augmente la susceptibilité de développer de l'obésité. Après l'expérience, les rates ovariectomisées sans exercice ont révélé les plus grands poids corporels. L'entraînement a pu renverser (de 7%) ce gain de poids induit par OVX en plus d'atténuer la résistance à l'insuline. Malgré tout, selon l'étude de Latour et al. [108], l'entraînement physique a amélioré la réponse insulinémique au glucose chez les rates ovariectomisées (OVX) sans changement notable de composition corporelle. Les données des études effectuées sur les femmes diabétiques de type 2 post-ménopausées et celles obtenues par Latour et al. portent à croire qu'en dépit de la possible implication d'une amélioration de la composition corporelle et/ou du profil lipidique, l'activité physique améliore également la sensibilité à l'insuline de façon directe. Il importe toutefois de rappeler que les rates ovariectomisées lors études animales mentionnées ci-haut ne sont pas diabétiques pour autant. C'est ainsi que dans la mesure où nous nous intéressons à la possible influence des hormones ovariennes sur la pathogénèse du DT2, le choix d'un modèle animal pouvant développer un DT2 (tel que les rats de souche ZDF) nous a paru judicieux pour la réalisation du présent travail.

## 4.2 Homéostasie musculaire du glucose

L'entraînement et l'exercice physique améliorent l'action de l'insuline chez les individus sains, les individus obèses ainsi que les individus diabétiques de type 2 [109]. La prescription exacte d'activité physique (volume, fréquence, intensité etc.) nécessaire à l'amélioration de l'action insulinémique n'est pas connue à l'heure actuelle. Il est toutefois reconnu que le muscle squelettique constitue un site majeur de l'homéostasie du glucose, tant insulino-dépendant qu'insulino-indépendant [18, 24].

L'insuline et l'exercice (via la contraction musculaire) sont les deux plus importants stimulateurs du transport cellulaire du glucose dans le muscle squelettique [24]. Tel que mentionné plus tôt dans ce mémoire, les mécanismes sous-jacents au transport du glucose stimulé par l'insuline sont relativement bien connus. Par contre, le transport du glucose stimulé par l'exercice est toutefois moins bien étudié. Des stimuli mécaniques tels que la contraction et l'étirement musculaires augmentent le transport du glucose dans le muscle, tant chez l'humain [110] que chez l'animal [111]. Cela est possible en raison d'une élévation du contenu de transporteurs du glucose dans le muscle squelettique. Les mécanismes moléculaires de l'amélioration du transport du glucose ainsi que de la sensibilité à l'insuline par l'exercice sous-tendent une augmentation dans le muscle squelettique de l'expression et/ou de l'activité de molécules-clés impliquées dans le métabolisme du glucose. Les effets de l'exercice sur la sensibilité et la signalisation de l'insuline, donc sur le transport du glucose sont complexes. Ces effets peuvent être de trois ordres [112]: 1) une augmentation aigüe du transport cellulaire du glucose dans le muscle durant l'exercice 2) une augmentation post-exercice de la sensibilité à l'insuline 3) des adaptations chroniques du muscle par l'entraînement. En réalité, ces trois aspects se chevauchent et contribuent tous à l'amélioration de l'homéostasie du glucose suscitée par l'exercice. L'entraînement physique chronique améliore le métabolisme insulino-dépendant du glucose chez les individus insulino-résistants et diabétiques de type 2. Chez les sujets sains, l'activité insulino-dépendante de PI3-K est augmentée par l'entraînement mais

pas chez les sujets insulino-résistants [113]. L'entraînement augmente variablement la phosphorylation ainsi que l'expression protéique de IRS-1 et d'Akt [66]. L'expression protéique de GLUT4, l'activité de la glycogène synthétase ainsi que de l'hexokinase se trouvent aussi augmentées par l'entraînement [66, 112]. Par exemple, l'amélioration de l'action de l'insuline sur le processus de transport du glucose suite à l'entraînement chez les rats Zucker obèses arrive principalement par une augmentation [114] de l'expression protéique du transporteur de glucose GLUT4 [115, 116] et par une augmentation de la translocation de GLUT4 au sarcolemme [117].

#### 4.3 Homéostasie pancréatique du glucose

Les effets de l'entraînement physique chronique sur la fonction pancréatique sont beaucoup moins bien étudiés que ceux de l'exercice aigu [114], mais leur bienfaits peuvent se faire sentir aussi rapidement qu'après 7 jours d'entraînement aérobie chez des individus intolérants au glucose [118]. Les plus récentes études suggèrent aussi que l'entraînement physique améliore la fonction  $\beta$ -pancréatique, et que ces bienfaits dépendent de l'intensité de l'effort [114]. L'intégrité structurelle des îlots pancréatiques s'en trouve également améliorée [119]. Dans son étude sur les rates Sprague-Dawley ovariectomisées et pancréactomisées à 90 %, Choi et al. [120] ont observé que l'entraînement en endurance améliore la sécrétion pancréatique d'insuline, augmente la prolifération et diminue l'apoptose de cellules  $\beta$ . De plus, il a été observé que des rats ZDF mâles pré-diabétiques voyaient diminuer leur décompensation  $\beta$ -pancréatique suite à un programme d'entraînement aérobie [121].

#### 4.4 Seconde hypothèse de travail

L'activité physique améliore la composition corporelle, la sensibilité à l'insuline, la tolérance au glucose ainsi que la fonction pancréatique; aussi bien chez les humains et animaux sains que symptomatiques. De récentes études effectuées sur des rates

ovariectomisées suggèrent que cela pourrait possiblement s'appliquer même en absence d'estrogènes ovariens. Nous nous attendions donc à ce que la pratique volontaire de la course chez des rats ZDF femelles ovariectomisées aie un effet protecteur sur leur homéostasie du glucose en contrecarrant les effets délétères de l'ovariectomie.

**5 Article de l'étude *Physical activity protects against withdrawal of estrogen protection on glucose homeostasis in ZDF rats.***

Le lecteur trouvera ci-joint à la page suivante le manuscrit provisoire de l'article à être publié dans le cadre du présent projet de maîtrise.



## **Physical activity protects against withdrawal of estrogen protection on glucose homeostasis in ZDF rats**

J. S. Mentor<sup>1</sup>, I. Côté<sup>1</sup>, É. T. Ngo Sock<sup>1</sup>, J.-M. Lavoie<sup>1</sup> and R. Bergeron<sup>1,2</sup>

Running title: Exercise in ovariectomized female ZDF rats.

<sup>1</sup>Departement of Kinesiology, University of Montreal, Montréal, QC, Canada

<sup>2</sup>The Montreal diabetes Research Center, CRCHUM, Montréal, QC, Canada

Word count: Abstract - 324, Text – 6 440

Number of Tables - 3, and Figures - 6

### **Address correspondence and reprint requests to:**

Dr Raynald Bergeron

University of Montréal

Montreal, Quebec, Canada.

Telephone: [REDACTED]

Fax: [REDACTED]

E-mail: [REDACTED]

**ABSTRACT**

Menopause is associated with insulin resistance and increased risks of type 2 diabetes in healthy human subjects. It is not known, however, if subjects with a pre-existing insulin-resistant condition are at greater risk and if physical activity can have a protective effect against the onset of diabetes when ovarian estrogens are no longer secreted. Importantly and in contrast to its male counterpart, female ZDF (Zucker diabetic fatty) rats does not develop diabetes on a standard diet. Thus, we hypothesized that withdrawal of ovarian estrogen through ovariectomy would trigger hyperglycaemia in female ZDF rats but only if they remain physically inactive. Ten-week old rats underwent either an ovariectomy (Ovx) or a sham operation (SHAM-Inactive,  $n=8$ ). Thereafter, ovariectomized rats engaged either in voluntary wheel cage running (OVX-Active,  $n=8$ ) or remained inactive (OVX-Inactive,  $n=8$ ) for the following 6 weeks. Fed glycaemia was significantly increased by Ovx ( $p<0.01$ ) and lowered back to SHAM-Inactive level in OVX-Active rats ( $p<0.01$ ). Ovx markedly decreased insulin-stimulated muscle glucose uptake ( $0.63 \pm 0.08 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  vs  $1.13 \pm 0.27 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). In addition OVX-Inactive rats showed an increase and a decrease respectively in liver triglyceride and glycogen contents (both  $p<0.001$ ) whereas pancreatic insulin content was increased ( $p<0.05$ ) when compared to SHAM-Inactive rats. Physical activity markedly improved glucose tolerance ( $p<0.01$ ) and insulin-stimulated muscle glucose uptake ( $p<0.05$ ) as compared to SHAM-Inactive rats. Ovx-induced alterations in pancreatic insulin content ( $p<0.01$ ) and liver glycogen ( $p<0.05$ ) were significantly improved by physical activity. Our data suggest that ovariectomy-induced loss of ovarian estrogens impairs glucose homeostasis in female ZDF rats without triggering overt type 2 diabetes. Physical activity improves glucose homeostasis despite the estrogen loss.

**Keywords:** ovariectomy, exercise, estrogen receptors, voluntary running, muscle glucose uptake, menopause

## INTRODUCTION

Compared to men and older women, adult women seem to be less prone to a vast array of health problems such as coronary heart diseases, metabolic syndrome and type 2 diabetes (T2D) [1, 2]. Much of this apparent protection benefiting adult women has been attributed to a purported ‘estrogen protection’ [3], which seems to vanish at menopause. Indeed, T2D risk begins to increase at about 40-50 years of age in women [1]. Decline in estrogen levels at the time of menopause may play a central role [1, 2, 4]. However, existing literature is conflicting [4]. Some evidence shows positive association of endogenous estrogen concentration with diabetes and inverse association with insulin sensitivity therefore suggesting an adverse effect of estrogen [5]. Nevertheless, changes in body composition, such as increases in visceral fat and decreases in muscle mass, are independently associated with menopause [1]. In turn, these changes in body composition negatively alter insulin sensibility and glucose tolerance in postmenopausal women [1, 6]. Moreover, visceral obesity and low muscle mass are also important risk factors for insulin resistance (IR) and T2D as well. Also, hormone replacement therapy (HRT) has at least neutral or beneficial effect on the changes of body composition associated with menopause [1, 4]. Data from various clinical studies suggest that HRT decreases the risks for T2D [4], as well as lowering glycaemia and enhancing whole-body insulin sensitivity in post menopausal women [1]. It is therefore not clear how estrogens can regulate glucose homeostasis; but there is ample evidence that the loss of estrogens characterizing menopause have the potential to increase risks for visceral obesity, IR and T2D in healthy women.

In addition to body composition and diet, physical activity is a pivotal determinant of T2D risk. Compared to non-menopausal women, postmenopausal women are more prone to sedentarism and loss of fitness, which could at least partly account for their lesser health status and quality of life [7]. On the other hand, it was shown in many studies that the negative changes in body composition associated with menopause can be at least partially mitigated by an increase in physical activity in this population [1, 8, 9]. A review by Asikainen et al. revealed that most randomized controlled trials

studying the health effects of exercise training on early postmenopausal women reported a reduction in body weight and body fat following training [10]. Exercise training not only promotes a reduction in body weight, but also improves insulin-dependent glucose metabolism [9] and reduces T2D risk[1].

Either because of advancing age, sub-optimal dietary regimes, decreased physical activity or a combination of these factors, prevalence of obesity and IR is increasing among adult women [6, 9]. Therefore, the rapidly aging population and the resulting surge in the number of women undergoing menopause raises two critical questions. First, whether or not menopause precipitates the pathogenesis of T2D in insulin-resistant women and secondly, if physical activity can be beneficial despite the loss of ovarian estrogens. Using ovariectomy, recent animal studies have underlined the important role that ovarian estrogens [2, 11-14] and physical activity [15, 16] may play in obese and insulin-resistant states. Ovariectomy is the surgical removal of ovaries widely used in animal studies to mimic the loss of ovarian estrogen synthesis characterizing human menopause [17]. As example, Saengsirisuwan and al. [15] found that 12 weeks of ovariectomy increased insulin resistance in female Sprague-Dawley rats, whereas both estradiol treatment and endurance exercise training reduced body weight and visceral fat significantly. Whole-body glucose tolerance and muscle glucose transport were also enhanced by both estradiol treatment and exercise training [15]. In a study by Zoth and al. [16], ovariectomy on female Wistar rats with diet-induced obesity further increased their susceptibility to develop obesity. In an additive manner, combination of HRT with exercise training positively affected outcomes related to the development of metabolic syndrome [16].

Nevertheless, because Sprague-Dawley and Wistar rats are not diabetic breeds *per se*, they may develop obesity and insulin resistance when challenged with a high fat diet (for instance), but they do not develop overt T2D. In addition, one should bear in mind that streptozotocin treatment targets pancreatic  $\beta$  cells, thereby resulting in type 1 diabetes (insulin-dependent) rather than a type 2 diabetes (insulin-resistant) [18-21]. With these considerations in mind, we decided to study the effects of ovarian

estrogen withdrawal (through ovariectomy) and voluntary exercise training (through wheel running) on glucose homeostasis of female Zucker diabetic rats (ZDF) rats. The ZDF rat is a well-known animal model closely mimicking T2D and its related complications [22]. T2D in ZDF rats is based primarily on an impaired glucose tolerance caused by a mutation of leptin receptor leading to insulin resistance [22] as well as an insulin-promoter mutation [23]. Both male and female ZDF rats are spontaneously obese and insulin-resistant, but only males eventually develop hyperglycaemia characteristic of T2D [24], in contrast to both Sprague-Dawley and Wistar rats. Interestingly, a high fat diet (48% kcal as fat [24]) is needed to induce T2D in female ZDF; a feature paralleling the observation that non-menopausal adult women are somewhat less prone to T2D and MS than their male and postmenopausal female counterparts [2]. Therefore, the female ZDF rat is an interesting animal model to study the pathogenesis of T2D in a context of ovarian estrogen loss. We performed the present study to test the two following hypotheses: 1) Loss of ovarian estrogen, through ovariectomy, in female ZDF rats will trigger hyperglycaemia, and 2) Voluntary exercise training will improve glucose homeostasis and prevent the onset of T2D in ovariectomized female ZDF rats.

## RESEARCH DESIGN AND METHODS

### Animals

Experimental protocol for the study has been accepted by the *Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Montreal* in agreement with The Canadian Council on Animal Care's rules (CCAC-CCPA). Twenty-four five-week old female Zucker diabetic fatty (ZDF; ZDF-Lepr<sup>fa</sup>/Crl) rats were purchased from Charles River Laboratories (Saint-Constant, Québec, Canada). Upon arrival, the rats were acclimatized to their new environment over a period of 5 days before initiating the experiment (day -5). Rats were individually housed in standard plastic cages in a temperature and humidity controlled facility on a 12 h light/dark cycle, with free access to rodent chow (Purina 5008) and tap water.

### Interventions

Four weeks later, at ten weeks of age, rats underwent either bilateral ovariectomy (OVX;  $n=16$ ) or bilateral sham operation (SHAM;  $n=8$ ) according to a technique described earlier [25]. One week after surgery, rats were placed in wheel cages for the following 6 weeks. According to the experimental design, wheel cages were either prevented from rotating (OVX-Inactive;  $n=8$  or SHAM-Inactive;  $n=8$ ) by being blocked or either left to rotate freely (OVX-Active;  $n=8$ ). Each wheel cage was equipped with a sensor connected to a computerized data acquisition system enabling the calculation of the running performance of individual rats on 24/7 basis. Food provision was stopped and exercise wheels were blocked 24h before glucose tolerance tests and euthanasia. A 24-hour period was chosen because a longer period without food would be otherwise problematic to sustain for our rats.

### Body weight, food intake, running distance and periodically-measured plasma parameters

Starting at day 0, rats were monitored daily for running distance and twice weekly for body weight and food intake. Heparinized tail blood was collected between 8:00-9:00 a.m. at day 0, before the start (day 28), after four weeks (day 56) of interventions for the determination of plasma glucose and insulin concentrations. A week prior to the

end of the study (day 65-66), an oral glucose tolerance test (OGTT; 2 g/kg b.w.) was performed following 4 hours of fasting. Heparinized tail blood was collected for plasma glucose and insulin determinations at time points as indicated in Figure 2.

### **Euthanasia, blood and tissue harvesting**

After six weeks of intervention, study rats were euthanized between 9:00 and 12:00 a.m. Food was removed from the animal's cage at least 3 hours prior to sacrifice. Blood collection from the inferior vena cava and tissue dissection were performed under isoflurane-induced anaesthesia and euthanasia by pneumothorax/exsanguination. Blood collected into syringes pre-treated with ethylenediaminetetraacetic acid (15%; EDTA) was centrifuged (1200 x g; 4°C; 12 min) and part of the plasma was immediately deproteinized with sulfosalicylic acid (5% SSA) and was further centrifugated (600 x g; 4°C; 10 min) for later GSSG/GSH assay (not reported here). All plasma was kept at -80°C until analyzed. As already described elsewhere [25, 26], tissues were removed and weighed in the following order: both left and right soleus muscles, left anterior liver lobe, pancreas, plantaris and gastrocnemius (red and white) muscles, uterus, fat pads (mesenteric, urogenital, retroperitoneal and subcutaneous) and heart. Except for the pancreas and the soleus muscle, all tissue samples were frozen in liquid nitrogen immediately after they were weighed. They were then stored at -80°C until analyses were performed. Soleus muscles were split. One half was used for glucose uptake determination as described by Wojtaszewski et al. [27]. The other half was incubated under similar conditions except that radioisotopes were excluded and muscles were used to assess insulin signalling molecules. Left solei were incubated in absence of insulin while the right solei were incubated in presence of 20 mU/mL insulin. The entire pancreas was excised, cleared of fat and lymph nodes, blotted, and weighed. The proximal section was immersion-fixed in 4% paraformaldehyde/100 mM PBS for further immunohistochemical analyses (not reported here). The distal portion was frozen in liquid nitrogen for further analysis of total insulin content. All rats were also visually inspected for presence or not of ovaries, and uteri were excised and weighed to confirm ovariectomy or sham operation.

### **Plasma and tissue assays**

Plasma glucose concentrations were measured using a detection kit based on glucose oxidase activity (WAKO Chemicals USA, Richmond, TX) whereas plasma insulin concentrations were measured using the enzyme-linked immunosorbent assay (Insulin rat ultrasensitive ELISA kit, ALPCO Immunoassays, Salem, NH). For both assays, reactions were read at a 532 nm wavelength using a Versa Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Pancreatic insulin content was measured by radioimmunoassay using the distal portion of the pancreas after acid/ethanol extraction from homogenized pancreas tissue. Liver triacylglycerols (TAG) contents were estimated from glycerol released after ethanolic KOH hydrolysis by using commercial kit from Sigma (St Louis, MO). Glycogen content for liver and muscle was determined spectrophotometrically using a method adapted from a protocol described by Lo et al. [28].

### **Muscle glucose uptake**

Isolated soleus muscle glucose uptake was determined using a method adapted from [29]. Briefly, intact left and right solei were carefully split in two halves, mounted on a support keeping each muscle at resting length and continuously gassed with 95 O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> and pre-incubated in 2 mM pyruvate Krebs-Ringer bicarbonate (KRB) buffer at 37°C for a 60 minutes recovery period. Then muscles were either incubated in the presence or absence of 20 mU/mL insulin-containing 2 mM pyruvate KRB buffer (37°C, 20 minutes) and one of the muscle halves was placed in a tracing buffer containing 1 mM 2-deoxy-D-glucose (2-DG) (1,5 µCi [1,2-<sup>3</sup>H]/mL) and 7 mM mannitol (0,45 µCi [<sup>14</sup>C]/mL (Perkin Elmer, Montréal, Québec; 34°C for 10 minutes) while the other half was not exposed to the radioisotopes and was used to assay insulin signalling. To end transport, muscles were transferred to ice-cold KRB buffer containing cytochalasin B (80 µM, Sigma), blotted, trimmed and frozen in liquid nitrogen. Muscles were processed as previously described [29].



**Muscle Akt activation**

To evaluate Akt and p-Akt muscle content, 50-100 mg of soleus muscle were homogenized in a buffer containing 20 mM HEPES (pH 7.4), 10 mM pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 3 mM sodium vanadate, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10  $\mu$ M leupeptin, 3 mM benzamidine, 10  $\mu$ g/ml aprotinin and 1 mM PMSF [30]. Part of the homogenates was used to determine their total protein content using the bicinchoninic acid technique. Tissue homogenates were then assayed using Invitrogen ELISA kits for both p(Ser473)-Akt and total Akt (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) according to manufacturer's directives.

**Muscle quantitative real-time PCR**

Approximately 20-30 mg of quick-frozen, non-fixed red gastrocnemius muscle from each subject was homogenized in 300  $\mu$ L of a  $\beta$ -mercaptoethanol-containing RLT buffer with a tissue lyser (MM301, Retsch, Haan, Germany) and 5 mm stainless beads. Total RNA was extracted using the Fibrous Tissue RNeasy Mini kit according to the manufacturer's instruction (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). The reverse transcription was performed by Genomics core facility of IRIC with 2  $\mu$ g of total RNA in a final volume of 20  $\mu$ L using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with random primers (Applied Biosystems) as described by the manufacturer. RT samples were stored at -20°C.

Gene expression level for endogenous controls was determined using pre-validated Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems). qPCR reactions in 384 well plate were performed using 1.5  $\mu$ l of cDNA samples (5-25 ng), 5  $\mu$ l of the TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.5  $\mu$ l of the TaqMan Gene Expression Assay (20X) and 3  $\mu$ l of water in a total volume of 10  $\mu$ l. The following assays were used as reference endogenous control genes: HPRT1 (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase; assay number Rn01527840) and ACTB (Beta-actin; assay number Rn00667869)

Gene expression level for target genes was determined using assays designed with the Universal Probe Library from Roche ([www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com)) and specific primers (Table 1). qPCR reactions for 384 well plate format were performed using 1.5  $\mu$ l of cDNA samples (5-25 ng), 5  $\mu$ l of the TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2  $\mu$ M of each primer and 1  $\mu$ M of a UPL probe in a total volume of 10  $\mu$ l.

The ABI PRISM<sup>®</sup> 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) was used to detect the amplification level and was programmed with an initial step of 3 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of: 5 sec at 95°C and 30 sec at 60°C. All reactions were run in triplicate and the average values of Cts were used for quantification. The relative quantification of target genes was determined using the  $\Delta\Delta$ CT method. Briefly, the Ct (threshold cycle) values of target genes were normalized to an endogenous control gene ( $\Delta$ CT = Ct<sub>target</sub> - Ct<sub>CTRL</sub>) and compared with a calibrator:  $\Delta\Delta$ CT =  $\Delta$ Ct<sub>Sample</sub> -  $\Delta$ Ct<sub>Calibrator</sub>. Relative expression (RQ) was calculated using the Sequence Detection System (SDS) 2.2.2 software (Applied Biosystems) and the formula is  $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ .

PCR products were normalized by the mean of the reference genes ACTB and HPRT1. The results obtained after normalisation for each specific product were expressed as fold changes over the response observed in one reference sample from the SHAM-Inactive groups, which was arbitrarily set as 1.0.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using SPSS software 15.0 (SPSS inc., Chicago IL, USA). The results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (sem). Data were analyzed using One-way analysis of variance (ANOVA) or a One-way ANOVA for repeated measures followed by Bonferroni post-hoc tests. *P* values of <0.05 were considered to be statistically significant.

## RESULTS

### **Body weight, food intake, running performance and periodically-measured plasma parameters**

Upon arrival, the animal's body weight averaged  $169 \pm 5$  g for the SHAM-Inactive control group,  $166 \pm 5$  g for the OVX-Inactive group and  $169 \pm 3$  g for the OVX-Active group. There was no significant difference between the three groups. As shown in Figure 1 however, rats of the OVX-Inactive group had a greater gain in body weight than the two other groups following the intervention ( $p < 0.05$ ).

Food intake was similar for the three groups prior to the interventions (Figure 1). Ovariectomy did not significantly affect daily food intake whereas voluntary training significantly increased daily food consumption ( $27.3 \pm 0.7$ g/day for OVX-Active and  $24.9 \pm 0.6$  g for SHAM-Inactive;  $p = 0.001$ ).

During the first week of running rats from the OVX-Active group increased their daily running distance from  $0.85 \pm 0.07$  km/day (day 33) to a peak of  $2.38 \pm 0.20$  km/day (day 40). From day 43 to day 70, the rats maintained their daily running distance between  $1.15 \pm 0.20$  km/day (day 60) and  $1.97 \pm 0.28$  km/day (day 56) until the day of sacrifice.

### **Skeletal muscle, fat mass and organ mass**

There was no significant difference in soleus, plantaris and gastrocnemius absolute muscle mass or muscle mass relative to whole body weight resulting from ovariectomy (Table 2). However, there was a tendency towards increased relative muscle mass as a result of physical activity in plantaris muscle ( $p = 0.096$ ) which reached significance in the soleus muscle (OVX-Active vs OVX-Inactive;  $p < 0.001$ )

No statistically significant difference was observed between the three groups for absolute abdominal fat mass (mesenteric, urogenital, retroperitoneal and subcutaneous masses combined) (group effect  $p = 0.286$ ). There was a significant decrease in relative (to body weight) abdominal fat mass with ovariectomy (OVX-

Inactive vs SHAM-Inactive;  $p=0.033$ ) that was not further influenced by physical activity (OVX-Active vs OVX-Inactive;  $p>0.05$ ). In contrast, the ovariectomy tended to decrease subcutaneous fat mass in both absolute and relative terms although it was not statistically significant (OVX-Inactive vs SHAM-Inactive;  $p>0.05$ ) whereas physical activity tended to reverse this tendency (Table 2).

Absolute and relative pancreas mass were not significantly affected by the present protocol. Relative heart mass was not affected by ovariectomy but was significantly increased by physical activity in ovariectomized rats (OVX-Active vs OVX-Inactive;  $p<0.01$ ). Not surprisingly, ovariectomy resulted in the reduction of the uterine mass in both inactive and active ovariectomized groups as compared to the SHAM group. Physical activity did not influence those results.

### **Plasma parameters**

Plasma glucose and insulin concentrations were monitored at days 0, 28, 42 and 56 (Table 3). All three groups had a similar fed-state glycaemia at the start of the study (ANOVA for inter-group significance,  $p=0.765$ ). By day 56 of the intervention, non-fasting plasma glucose concentration in the OVX-Inactive rats was significantly higher than in the SHAM-Inactive group (Table 3). As soon as two weeks after the start of the running regimen, non-fasting plasma glucose concentration was significantly lower in the OVX-Active rats as compared to the OVX-Inactive rats. Ovariectomy did not significantly affect non-fasting plasma insulin concentration (Table 3). On the other hand, physical activity resulted in lower non-fasting plasma insulin concentrations in ovariectomized rats as compared to their OVX-Inactive rats as observed on day 56.

### **OGTT and pancreatic insulin content**

The oral glucose tolerance test (Figures 2A-2F) revealed no significant difference between the OVX-Inactive group and the control group (SHAM-Inactive) for plasma glucose and insulin concentrations. The calculated insulinogenic index (IGI), a reflection of insulin secretion capacity (calculated as the ratio of the increment in

plasma insulin level to that in plasma glucose level during the first 30 min after glucose ingestion [31]), was not significantly altered in the OVX-Inactive group as compared to the SHAM-Inactive group. In addition, the whole body insulin sensitivity index (WBISI) was not affected either by the ovariectomy. In contrast, plasma glucose and insulin concentrations were significantly lower in the OVX-Active group as compared to the OVX-Inactive group. Consequently, the OVX-Active group had higher insulinogenic index and WBISI as compared to the OVX-Inactive group ( $p<0.01$ ) suggesting respectively, an improved insulin secretion capacity and improved peripheral insulin action. Finally, pancreas insulin content was significantly increased with ovariectomy ( $p<0.05$ ), as physical activity resulted in lower insulin content compared to OVX-Inactive rats ( $p<0.01$ ; Figure 2G).

### **Metabolic tissue markers**

Neither ovariectomy, nor physical activity affected the plantaris glycogen content (Figure 3A). On the other hand, ovariectomy did significantly lower glycogen content in the liver while exercise training enhanced it (Figure 3B). Compared to the two other groups, rats from the OVX-Inactive group showed significantly higher liver triglyceride contents ( $p<0.001$  vs both SHAM-Inactive and OVX-Active groups; Figure 3C).

### **Muscle glucose uptake and Akt activation**

The insulin-stimulated fold increase in glucose uptake (Figure 4A) tended to be lower in the OVX-Inactive group as compared to the SHAM-Inactive control group ( $p=0.168$ ). Physical activity increased insulin-stimulated glucose uptake in OVX-Active versus OVX-Inactive rats ( $p<0.05$ ). As seen in Figure 4B, total Akt in soleus muscle was not affected neither by the ovariectomy nor the voluntary running program. On the other hand, ovariectomy tended to reduce insulin-stimulated fold-increase in p-Akt ( $p=0.141$ ; OVX-Inactive vs SHAM-Inactive), while physical training restored it ( $p<0.05$  OVX-Active vs OVX-Inactive; Figure 4C).

### **Gene expression of glucose homeostasis and estrogen function markers**

The OVX-Inactive group consistently showed tendencies for lower gene expression as compared to the SHAM-Inactive group for the following genes: *Gys1* (Figure 5D), *Pfkm* (Figure 5C) and *Slc2a4* (Figure 5A) and *Esr1* (Figure 6A) mRNA content. However, no statistical significance was attained between these two groups with the exception of *Pfkm* gene ( $p < 0.05$ ). On the other hand *Slc2a4*, *Pfkm*, *Gys1* and estrogen receptor  $\alpha$  muscle gene expressions were significantly elevated in the OVX-Active group as compared to the OVX-Inactive group.

### **DISCUSSION**

The purpose of the present study was to determine the effects of ovarian estrogen withdrawal; with and without physical activity on glucose homeostasis in ZDF (Zucker diabetic fatty) female rats, an animal model of diabetes. We postulated that, unlike their male counterparts, female ZDF rats on Purina 5008 are protected from diabetes because of ovarian ‘estrogen protection’. Consequently, we hypothesized that 1) ovariectomy in female ZDF rats would result in an aggravation of insulin resistance therefore precipitating the development of hyperglycaemia and that 2) voluntary exercise training would enhance glucose homeostasis in ovariectomized female ZDF rats. To test both hypotheses, ten-week old rats underwent either an ovariectomy (Ovx) or a sham operation (SHAM-Inactive,  $n=8$ ). Thereafter, ovariectomized rats engaged either in voluntary wheel cage running (OVX-Active,  $n=8$ ) or remained inactive (OVX-Inactive,  $n=8$ ) for the following 6 weeks. Our data indicate that ovariectomy can deteriorate glucose homeostasis by altering glucose control and insulin-stimulated muscle glucose uptake in female ZDF rats, whereas physical activity improves it despite their loss of ovarian hormones by enhancing the same parameters in addition to glucose tolerance and associated insulin sensitivity.

### **Food intake and obesity**

Generally, current literature suggests that menopause- or ovariectomy-induced estrogen loss is associated with increased food intake, body weight gain and negative

alterations in body composition (fat mass gain and muscle mass loss)[9, 15, 32, 33]. In the present study, ovariectomy had a significant effect on body weight gain at days 63, 67 and 71 (Figure 1) without affecting food intake, which is already almost twice as high in ZDF rats as compared to lean littermates [34]. Rats of the OVX-Inactive group had a greater gain in body weight over time than the two other groups, including the OVX-Active group. These results suggest that ovariectomy actually exacerbated body weight gain over time whereas physical training lowered it. Interestingly, food intake for the OVX-Active group was higher compared to the two other groups, indicating physical activity made it possible for the OVX-Active rats to maintain a lower body weight gain over time in spite of the increased food intake. Regular physical activity is known to elicit greater needs of calorie intake through an increase in energy expenditure – voluntary or involuntary - in those performing it, so that the increased demand in energy supply are adequately met [35]. No statistically significant change in intra-abdominal fat mass was observed with either ovariectomy or exercise training for our animals (Table 2). Subcutaneous fat mass tended to increase with ovariectomy as physical activity tended to decrease it (Table 2). It is possible that ovariectomy was a more potent intervention than what voluntary physical activity could offset.

Our results regarding fat and muscle mass distribution show both similarities as well as discrepancies in regards with previous research. Zoth et al. [16] showed that ovariectomy in female Wistar rats increased the susceptibility to develop obesity while a combination of hormone replacement therapy (HRT) and physical activity had enhanced various parameters related to lipid metabolism (i.e.: serum levels of cholesterol, triglyceride and low-density lipoprotein cholesterol), even more so than HRT alone. Compared with SHAM-operated counterparts, Saengsirisuwan [15] also reported that OVX Sprague-Dawley rats had greater final body weights and visceral fat content. It is possible that with ovariectomy, much of the fat mass has actually infiltrated in various tissues and organs such as the liver, the pancreas and some of the skeletal muscle. Indeed, liver TG values were elevated (Figure 3) with ovariectomy compared to the SHAM-Inactive group, suggesting that a high degree of

hepatic lipid infiltration has taken place as previously reported in ovariectomized female Sprague-Dawley rats by our group [25, 26, 36]. Although not assessed in the present study, evidence suggest an association between loss of estrogen function and lipid infiltration in skeletal muscle and pancreas [37]. In his study, Ribas et al. reported that ER $\alpha$ -KO mice exhibited accumulation of bioactive lipid intermediates in skeletal muscle [37]. Such increase in intramuscular lipid content is corroborated in a study of postmenopausal women [38]. Future studies will need to specifically address the issue of lipid infiltration across the organism in a situation of ovarian estrogen loss.

### **Glucose homeostasis**

*Glucose control* - As a pre-diabetic feature, hyperinsulinemia and elevated pancreatic insulin production indicates a dysfunction of glucose homeostasis [39]. Significant increase in plasma glucose was observed with ovariectomy at day 56 (Table 3), whereas ovariectomy had a neutral effect on plasma insulin concentrations at day 56 and an incremental effect on pancreatic insulin content (Figure 2C) respectively. The elevated values of OVX-Inactive group's fed-state glycaemia at day 56 relative to their SHAM-Inactive counterparts (Table 3) do suggest an impairment of tissue glucose handling. Indeed, liver glycogen content was lowered by ovariectomy (Figure 3), indicating that the liver was affected in its ability to clear the glucose out of blood circulation in order to store it in the form of glycogen. Further promoting lesser glucose control, insulin-stimulated muscle glucose uptake value was lower after ovariectomy (see glucose uptake section). Given the preponderant role of skeletal muscle in blood glucose clearance [40], it can be said that the decreased muscle uptake was also a contributing factor to the elevated glycaemia in OVX-Inactive rats. However, it must be noted that non-fasting glycaemia observed in OVX-Inactive rats was not as alarming as that normally observed in male ZDF rats for the same age. Values for non-fasting glycaemia and insulinemia normally seen for 14-week old male ZDF rats (corresponding to day 56 for our study) are  $\geq 400$  mg/dL and  $\leq 6$  ng/mL respectively [34], which are more typical of T2D in ZDF rats as pancreatic decompensation has already taken place in male at this stage [34]. Therefore, contrary



to what we expected from a diabetic breed of rat such as ZDF, the co-existence of elevated insulin output, elevated glycaemia and alterations of glucose handling by tissues in the OVX-Inactive group suggest that ovariectomy did negatively affect glucose control but not to the point of having the same degree of glucose control impairment observed in male ZDF rats at the same stage of T2D pathogenesis; with 200 mg/dL having been used as a cut-off value for diabetic hyperglycemia in ZDF rats [41].

Chronic physical activity is known to be beneficial for glucose control through maintaining glycaemia at lower levels than those normally witnessed in sedentary human and animal subjects [42]. Exercise training is efficient at attenuating the development of hyperglycaemia in female ZDF rats in a significant manner [24]; this also have held true in our experiment. Plasma glucose and insulin concentrations were lowered in ovariectomized rats that had been physically active for 4 weeks (day 56 of intervention) as opposed to OVX-Inactive rats (Table 3). In agreement with the current findings, Zoth et al.[16] reported that ovariectomized Wistar rats without exercise training tended to have the highest levels of insulin which could be rectified by exercise training. Hepatic glycogen content seen in OVX-Active rats is also consistent with decreased hyperglycaemia. Taken together, our results suggest that physical activity contributes to the maintenance of better glucose control despite the loss of ovarian estrogens.

*Glucose tolerance* – Whole body glucose homeostasis was evaluated during an OGTT. Ovariectomy had a neutral effect on the glycemic excursion and plasma insulin concentrations during the glucose tolerance test. Using both glucose and insulin responses during OGTT, we calculated the whole body insulin sensitivity index (WBISI or *Matsuda index*; [43]) and the insulinogenic index (IGI; [44]). Based on these calculations, it is suggested that ovariectomy did not significantly impair whole body insulin sensitivity nor insulin secretion capacity. Previous animal and human studies have linked loss of ovarian estrogen and estrogen function with glucose intolerance and insulin resistance [3, 45-50], which is not consistent with our

results. As example, it has been shown in a study by Bailey et al. [49] that ovariectomy increases the incidence and severity of experimental diabetes in female animals. It caused a 40% increase in plasma glucose concentrations during glucose tolerance tests and a 26% decrease in plasma insulin response to glucose, compared with control mice [49]. In a recent study by Pirimoglu et al. [45], impairment of glucose tolerance was increased after the abrupt withdrawal of ovarian function (through oophorectomy) in premenopausal women. By the age of 15 weeks – when the OGTT took place – male ZDF rats show overt diabetes OGTT data [34, 51], as reflected by a glucose AUC approximately 1.9 fold higher than what is observed in our female ZDF rats. Similarly, Wargent et al.[52] reported much higher AUC's for both plasma glucose and insulin in 15-week old male ZDF control rats as compared to our ovariectomized female ZDF rats. Overall, our OGTT data suggest that, although clearly not normal glucose tolerant, female ZDF rats did not become more glucose intolerant after ovariectomy. Altogether, non-fasting plasma glucose elevation and OGTT data suggest a mild disruption of whole body glucose homeostasis in ovariectomized ZDF rats.

Physical activity has been shown to improve glucose tolerance and insulin sensitivity [42]. Saengsirisuwan et al. [15] reported that exercise training improved insulin sensitivity in ovariectomized Sprague-Dawley rats. Similarly, Smith et al.[24] observed that exercise training blunted the progression of diet-induced insulin resistance in female ZDF rats. As reported above, despite no major effects of ovariectomy, our study showed that both glucose and insulin concentrations assessed during OGTT were significantly lowered by physical activity in ovariectomized rats (Figure 2). Physically active OVX rats showed increased calculated insulin secretion capacity and insulin sensitivity (respectively; Figure 2E and 2F). Despite ovariectomy, female ZDF rats still improved their glucose tolerance and insulin sensitivity as a result of being physically active.

*Muscle glucose uptake and metabolism* – Although not statistically diminished, several alterations in markers of muscle glucose metabolism such as insulin-

stimulated glucose uptake, phosphorylation of key modulator of insulin signalling Akt and gene expression of important enzyme regulating cellular glucose metabolism (phosphofructokinase;  $p < 0.05$ , hexokinase II, glycogen synthase, GLUT-4) altogether suggest that the loss of ovarian estrogens negatively affected glucose metabolism in soleus muscle possibly impairing muscle-driven lowering of blood glucose. Consistent with these observations, Pua and Bailey [53] found that ovariectomy decreased insulin-stimulated skeletal muscle glucose uptake in mice. Similarly, Rincon et al. [54] also showed that ovariectomized rats exhibited decreased insulin-stimulated glucose disposal and reduced skeletal muscle glycogen synthase expression. Taken together, these results suggest that ovarian hormone deficiency is associated with decreased insulin-stimulated glucose uptake while our muscle data suggest that insulin stimulated glucose transport did not take place in solei following ovariectomy.

Data regarding the impact of ovariectomy/menopause on expression of glucose metabolism in skeletal muscle are rather sparse. In the present experiment, Pfk mRNA (Phosphofructokinase) content was significantly altered by ovariectomy in agreement with studies where ovariectomized rats had a compromised phosphofructokinase enzymatic activity that was restored by  $17\beta$ -estradiol administration [55]. Other studies have also reported a decrease in both protein expression and enzymatic activity of glycogen synthase in skeletal muscle of ovariectomized rats [54, 56]. Hexokinase-2 and phosphofructokinase are rate-limiting enzymes in glycolysis whereas glycogen synthase is responsible for tissular glucose storing in the form of glycogen (glycogenesis). Not only the results suggest that ovariectomy negatively impacted on the skeletal muscle ability to take up circulating glucose after insulin stimulation, but they also suggest that its ability to use up the taken glucose as an immediate source of energy (glycolysis) or for energy storing (glycogenesis) was also impaired by ovariectomy. This impairment of muscle glucose metabolism may play a role in the deterioration of blood glucose control discussed earlier.

Overall, ovariectomy in female ZDF rats induced mild deterioration to whole body and muscle glucose metabolism. It was hypothesized that the loss of ovarian estrogens following such intervention would trigger overt diabetes in female ZDF rats. This was not the case. One limitation of the present study is the fact that our female ZDF rats were still young when studied (10 to 16 weeks old during intervention). It is possible that OVX in older rats would have been more detrimental on glucose homeostasis.

Saengsrisuwan et al. [15] observed that exercise training corrected the diminished insulin-stimulated skeletal muscle glucose transport in ovariectomized rats, which was explained in part by the elevated GLUT4 protein expression. The beneficial effects of exercise training on glucose transport system were comparable to those by estrogen replacement [15]. In a recent study performed in ovariectomized Sprague-Dawley rats [57], activation of ER $\alpha$  with PPT (propyl pyrazole triol, an ER $\alpha$ -selective agonist) resulted in increased insulin-stimulated glucose uptake into the soleus and EDL muscles, along with activation of insulin signalling intermediates; phospho-Akt (pAkt) and pAkt substrate (PAS) GLUT4 protein content was increased only in the EDL muscle. Consistently with these results, rats the OVX-Active group showed significant increases in insulin-stimulated glucose uptake and phosphorylation of Akt (Figure 4) as well as gene expression of GLUT4, phosphofruktokinase and glycogen synthase in red gastrocnemius muscle as compared to their OVX-Inactive counterparts (Figure 5). In short, physical activity undertaken by ovariectomized ZDF rats enhances muscle glucose metabolism. It is noteworthy that gene expression of muscle ER $\alpha$  receptor was increased by our training intervention (Figure 6A), As discussed in the next paragraph, these results suggest that ER $\alpha$  receptor may have play a role in physical activity-induced improvement in muscle glucose uptake and metabolism.

#### **A possible role for estrogen receptors?**

The second aim of this study was to determine whether voluntary physical activity could prove beneficial for ovariectomized ZDF rats in spite of ovarian estrogen loss.

OVX rats showed lower uterine mass compared to SHAM-Inactive rats (Table 2) thereby demonstrating the effectiveness of ovariectomies. Although ovariectomy consists of surgically removing the main organs of estrogen production (i.e.: the ovaries), the following loss of circulating estrogens is not fully complete. It is well recognized that ovariectomy results in a substantial decrease in circulating 17 $\beta$ -estradiol levels [15]. However adrenal glands are another (although minor) site of estrogen production and variable amounts of circulating estrogens can therefore persist after ovariectomy. Choi et al [58]. observed that serum 17 $\beta$ -estradiol of ovariectomized rats was  $5.3 \pm 1.8$  pg/mL in the Sham group whereas the OVX group had a significantly reduced serum 17 $\beta$ -estradiol value of  $1.6 \pm 0.7$  pg/mL. [58]. In yet another study 17 $\beta$ -estradiol levels in OVX rats were still ~75% of those measured in Sham [59]. Previous studies show that estrogens are beneficial for maintaining blood glucose levels and helping the body respond to insulin [57]. Despite these previous findings, the mechanisms by which estrogens work are still being investigated [57]. It has been reported that the beneficial effects of exercise training on muscle glucose transport were comparable to those associated with estrogen replacement in ovariectomized rats [15]. It is suggested that physical activity could make up for the loss of estrogen following ovariectomy according to two mechanisms 1) by favoring adrenal estrogen production to a certain extent; 2) or by altering peripheral tissue's sensitivity to residual estrogen action via changes in cellular estrogen action. Judging from Choi's study results, the second scenario is more likely [58]. Hence, regular exercise in ovariectomized rats did not alter serum 17 $\beta$ -estradiol ( $1.8 \pm 0.6$  pg/mL for the OVX-EX group vs  $1.6 \pm 0.7$  pg/mL for the OVX group) suggesting that exercise did not stimulate adrenal estrogen production. In the present study, ovariectomy did not affect estrogen receptor  $\alpha$ - and  $\beta$  gene expression in skeletal muscle (Figure 7). Interestingly, physical activity significantly increased the gene expression of ER $\alpha$  receptor. Along these lines, endurance exercise training enhanced ER $\alpha$  receptor gene expression in three different skeletal muscles in female Wistar rats [60]. Estrogen production as small as that found in men, whose estrogen production is only a fraction of that produced in nonmenopausal women [61], seem to suffice to incur benefits on glucose homeostasis [61]. Indeed, men with defective aromatase enzyme

and/or ER $\alpha$  receptor have an impaired glucose metabolism and are insulin-resistant [46, 62]. In addition, Ribas et al. [37] observed that ER $\alpha$ -KO mice exhibited impaired glucose tolerance and marked skeletal muscle insulin resistance. Furthermore, both PPT and estradiol treatments improved glucose tolerance and insulin sensitivity and fasting blood glucose in ovariectomized ob/ob mice [63]. More recently [57], specific activation of estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) with PPT (propylpyrazole triol, an ER $\alpha$ -specific pharmacological agonist) increased insulin-stimulated skeletal muscle glucose uptake in ovariectomized female rats. Activation of estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) alone or activation of both ER $\alpha$  and ER $\beta$  together did not increase glucose uptake into skeletal muscle. Those results suggest that estrogen's beneficial effect on muscle glucose uptake occurs by activating ER $\alpha$ . Based on those published results, it is tempting to postulate that improvement in muscle glucose metabolism in physically active ovariectomized ZDF rats are, at least in part, a consequence of enhanced estrogen signalling as suggested by the increased ER $\alpha$  gene expression.

## CONCLUSION

Numerous clinical and basic studies demonstrate that estrogens contribute to glucose homeostasis [57]. The beneficial effects of estrogens on insulin action and glucose homeostasis are supported by studies showing insulin sensitivity is higher in premenopausal women compared with age-matched men [57]. Following menopause, a significant decline in insulin sensitivity occurs along with a corresponding increase in fat mass [9, 15, 32, 33]. Ovariectomy has also been shown to impair insulin sensitivity and glucose metabolism in animal models [57]. In addition, oestrogen replacement can ameliorate the increased risk for type 2 diabetes in postmenopausal women and improve whole body [57] and skeletal muscle glucose metabolism [57]. We hypothesized that unlike their male counterparts, female ZDF rats (an animal model of diabetes) on Purina 5008 are protected from diabetes because of their higher oestrogen levels. Thus we studied the effects of ovariectomy and physical activity on glucose homeostasis in these rats, in a context of T2D development. Our data suggest that ovariectomy can negatively alter glucose homeostasis in insulin-resistant female ZDF rats, but without precipitating T2D as such; whereas physical activity gives a

protective effect on glucose homeostasis in female ZDF rats despite their loss of ovarian hormones.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by grants from the *National Sciences and Engineering Research Council of Canada* (R00153) and the *Canadian Institutes of Health Research* (T0602 145.02) Special thanks go to Pierre Corriveau (M.Sc.) for his invaluable technical contribution, to Abdolnasser Pighon (Ph.D.) for his helpful insights into animal surgery procedures and to the graduate and undergraduate students from the kinesiology department who took part to the various experiments (S. Desmarais, P.-M. Dubois, C. Lafortune, A. Marie-Joseph and J. Therrien). We are also greatly thankful to the Genomics core facility of IRIC (R. Lambert) and the CHUM Research Center (E. Joly and staffs) for their material and technical assistance during the project.

#### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Szmulowicz, E.D., C.A. Stuenkel, and E.W. Seely, *Influence of menopause on diabetes and diabetes risk*. Nat Rev Endocrinol, 2009. **5**(9): p. 553-558.
2. Ren, J. and R.O. Kelley, *Cardiac Health in Women With Metabolic Syndrome: Clinical Aspects and Pathophysiology*. Obesity, 2009. **17**(6): p. 1114-1123.
3. Heine, P.A., et al. *Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- $\alpha$  knockout mice*.
4. Santen, R.J., et al., *Postmenopausal Hormone Therapy: An Endocrine Society Scientific Statement*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2010: p. jc.2009-2509.
5. Phillips, G.B., *Endogenous sex hormones and type 2 diabetes risk*. JAMA : the journal of the American Medical Association, 2006. **296**(2): p. 168-9.
6. Teede, H.J., C. Lombard, and A.A. Deeks, *Obesity, metabolic complications and the menopause: an opportunity for prevention*. Climacteric : the journal of the International Menopause Society, 2010. **13**(3): p. 203-9.
7. Lara, S., G. Casanova, and P.M. Spritzer, *Influence of habitual physical activity on body composition, fat distribution and metabolic variables in early postmenopausal women receiving hormonal therapy*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. **In Press, Corrected Proof**.
8. Manson, J.E., et al., *A prospective study of postmenopausal estrogen therapy and subsequent incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus*. Annals of Epidemiology, 1992. **2**(5): p. 665-73.
9. Hagey, A.R. and M.P. Warren, *Exercise and Menopause: Positive Health Effects*. MENOPAUSE MANAGEMENT, 2006. **15**(3): p. 19-25.
10. Asikainen, T.-M., K. Kukkonen-Harjula, and S. Miilunpalo, *Exercise for Health for Early Postmenopausal Women: A Systematic Review of Randomised Controlled Trials*. Sports Medicine, 2004. **34**(11): p. 753-778.
11. Mu, P., et al., *17 $\beta$ -Estradiol attenuates diet-induced insulin resistance and glucose intolerance through up-regulation of caveolin-3*. Irish Journal of Medical Science, 2010: p. 1-7.
12. Riedl, I., M. Yoshioka, and J. St-Amand, *Concomitant modulation of transcripts related to fiber type determination and energy metabolism in skeletal muscle of female ovariectomized mice by estradiol injection*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2010. **122**(1-3): p. 91-99.
13. Yamabe, N., K.S. Kang, and B.T. Zhu, *Beneficial effect of 17 $\beta$ -estradiol on hyperglycemia and islet  $\beta$ -cell functions in a streptozotocin-induced diabetic rat model*. Toxicology and applied pharmacology., 2010. **249**(1): p. 76.
14. Yamashita, H., et al., *Effect of estrogen on electroretinographic responses in streptozotocin-induced diabetic female rats*. Experimental Eye Research, 2010. **90**(5): p. 591-597.
15. Saengsirisuwan, V., et al., *Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement*. Metabolism, 2009. **58**(1): p. 38-47.



16. Zoth, N., et al., *Physical activity and estrogen treatment reduce visceral body fat and serum levels of leptin in an additive manner in a diet induced animal model of obesity*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. **In Press, Uncorrected Proof**.
17. Van Kempen, T.A., T.A. Milner, and E.M. Waters, *Accelerated Ovarian Failure: A novel, chemically induced animal model of menopause*. Brain Research. **In Press, Corrected Proof**.
18. Kim, N.N., et al., *Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with changes in vaginal hemodynamics, morphology and biochemical markers*. BMC Physiology, 2006. **6**.
19. Muller, Y.D., et al., *Immunosuppressive Effects of Streptozotocin-Induced Diabetes Result in Absolute Lymphopenia and a Relative Increase of T-Regulatory Cells*. Diabetes, 2011.
20. Arora, S., K.O. Shreesh, and V. Divya, *Characterisation of Streptozotocin Induced Diabetes Mellitus in Swiss Albino Mice*. Global Journal of Pharmacology, 2009. **3**(2): p. 81-84.
21. Rossini, A.A., et al., *Studies of Streptozotocin-Induced Insulinitis and Diabetes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977. **74**(6): p. 2485-2489.
22. Shafrir, E., A.A.F. Sima, and C. Ebooks. *Animal Models in Diabetes : A Primer*. 2000; Available from: [http://www.UCM.ebib.com/EBLWeb/patron?target=patron&extendedid=P\\_1\\_81592\\_0&](http://www.UCM.ebib.com/EBLWeb/patron?target=patron&extendedid=P_1_81592_0&).
23. Griffen, S.C., J. Wang, and M.S. German, *A genetic defect in beta-cell gene expression segregates independently from the fa locus in the ZDF rat*. Diabetes, 2001. **50**(1): p. 63-8.
24. Smith, A.C., et al., *Metformin and exercise reduce muscle FAT/CD36 and lipid accumulation and blunt the progression of high-fat diet-induced hyperglycemia*. American journal of physiology. Endocrinology and metabolism, 2007. **293**(1): p. 172-81.
25. Pighon, A., et al., *Does exercise training prior to ovariectomy protect against liver and adipocyte fat accumulation in rats?* Climacteric Climacteric, 2010. **13**(3): p. 238-248.
26. Pighon, A., et al., *Substituting food restriction by resistance training prevents liver and body fat regain in ovariectomized rats*. Climacteric, 2009. **12**(2): p. 153-164.
27. Wojtaszewski, J.F., et al., *Exercise modulates postreceptor insulin signaling and glucose transport in muscle-specific insulin receptor knockout mice*. The Journal of clinical investigation, 1999. **104**(9): p. 1257-64.
28. Lo, S., J.C. Russell, and A.W. Taylor, *Determination of glycogen in small tissue samples*. Journal of Applied Physiology, 1970. **28**(2): p. 234-6.
29. Brüning, J.C., et al., *Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles*. Cell, 1997. **88**(4): p. 561-72.
30. Sakamoto, K., et al., *Contraction regulation of Akt in rat skeletal muscle*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(14): p. 11910-7.
31. Miyazaki, Y., et al., *Predictors of improved glycaemic control with rosiglitazone therapy in type 2 diabetic patients: a practical approach for the*

- primary care physician*. The British Journal of Diabetes & Vascular Disease, 2005. **5**(1): p. 28-35.
32. Maltais, M.L., J. Desroches, and I.J. Dionne, *Changes in muscle mass and strength after menopause*. Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions, 2009. **9**(4): p. 186-97.
  33. Meyer, M.R., et al., *Obesity, insulin resistance and diabetes: sex differences and role of oestrogen receptors*. Acta Physiologica, 2011: p. no-no.
  34. Bergeron, R., et al., *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)- $\alpha$  Agonism Prevents the Onset of Type 2 Diabetes in Zucker Diabetic Fatty Rats: A Comparison with PPAR $\alpha$  Agonism*. Endocrinology, 2006. **147**(9): p. 4252-4262.
  35. Major, G.C., et al., *Energy Expenditure from Physical Activity and the Metabolic Risk Profile at Menopause*. Medicine & Science in Sports & Exercise, 2005. **37**(2): p. 204-212.
  36. Paquette, A., et al., *Fatty Acid Oxidation is Decreased in the Liver of Ovariectomized Rats*. Hormone and Metabolic Research, 2009. **41**(07): p. 511,515.
  37. Ribas, V., et al., *Impaired oxidative metabolism and inflammation are associated with insulin resistance in ER $\alpha$ -deficient mice*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2010. **298**(2): p. E304-319.
  38. Maltais, M.L., J. Desroches, and I.J. Dionne, *Changes in muscle mass and strength after menopause*. Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions, 2009. **9**(4).
  39. DeFronzo, R.A., *Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. The Medical clinics of North America, 2004. **88**(4): p. 787-835.
  40. DeFronzo, R.A. and D. Tripathy, *Skeletal Muscle Insulin Resistance Is the Primary Defect in Type 2 Diabetes*. Diabetes Care, 2009. **32**(suppl 2): p. S157-S163.
  41. Romanovsky, D., J.C. Walker, and M. Dobretsov, *Pressure pain precedes development of type 2 disease in Zucker rat model of diabetes*. Neuroscience Letters, 2008. **445**(3): p. 220-223.
  42. Hawley, J.A. and J.R. Zierath, *Physical activity and type 2 diabetes : therapeutic effects and mechanisms of action*. 2008, Champaign, IL: Human Kinetics.
  43. Matsuda, M. and R.A. DeFronzo, *Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp*. Diabetes Care, 1999. **22**(9): p. 1462-70.
  44. Seltzer, H.S., et al., *Insulin secretion in response to glycemic stimulus: relation of delayed initial release to carbohydrate intolerance in mild diabetes mellitus*. The Journal of clinical investigation, 1967. **46**(3): p. 323-35.
  45. Pirimoglu, Z.M., et al., *Glucose tolerance of premenopausal women after menopause due to surgical removal of ovaries*. Climacteric. **0**(0): p. 1-5.
  46. Mauvais-Jarvis, F., *Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2010. **In Press, Corrected Proof**.

47. Morishima, A., M.M. Grumbach, and E.R. Simpson, *Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1995. **80**(12): p. pp. 3689-3698.
48. Jones, K.L. *Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity*. 2000; Available from: <http://arrow.monash.edu.au/hdl/1959.1/246537>.
49. Bailey, C.J. and H. Ahmed-Sorour, *Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis. Effects of insulin secretion*. Diabetologia, 1980. **19**(5): p. 475-81.
50. Wu, S.-I., P. Chou, and S.-T. Tsai, *The impact of years since menopause on the development of impaired glucose tolerance*. Journal of Clinical Epidemiology, 2001. **54**(2): p. 117-120.
51. Paulsen, S.J., et al., *Stereological assessment of pancreatic beta-cell mass development in male Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats: correlation with pancreatic beta-cell function*. Journal of Anatomy, 2010. **217**(5): p. 624-30.
52. Wargent, E., et al., *Improvement of glucose tolerance in Zucker diabetic fatty rats by long-term treatment with the dipeptidyl peptidase inhibitor P32/98: comparison with and combination with rosiglitazone*. Diabetes, Obesity and Metabolism, 2005. **7**(2): p. 170-181.
53. Puah, J.A. and C.J. Bailey, *Effect of ovarian hormones on glucose metabolism in mouse soleus muscle*. Endocrinology, 1985. **117**(4): p. 1336-40.
54. Rincon, J., et al., *Mechanisms behind insulin resistance in rat skeletal muscle after oophorectomy and additional testosterone treatment*. Diabetes, 1996. **45**(5): p. 615-21.
55. Singhal, R.L. and J.R.E. Valadares, *The effect of estrogen administration on phosphofructokinase activity in the rat uterus*. Life Sciences, 1966. **5**(14): p. 1299-1307.
56. Kumagai, S., A. Holmång, and P. Björntorp, *The effects of oestrogen and progesterone on insulin sensitivity in female rats*. Acta Physiologica Scandinavica, 1993. **149**(1): p. 91-97.
57. Gorres, B.K., et al., *In vivo stimulation of oestrogen receptor  $\alpha$  increases insulin-stimulated skeletal muscle glucose uptake*. The Journal of Physiology, 2011. **589**(8): p. 2041-2054.
58. Choi, S.B., J.S. Jang, and S. Park, *Estrogen and exercise may enhance beta-cell function and mass via insulin receptor substrate 2 induction in ovariectomized diabetic rats*. Endocrinology, 2005. **146**(11): p. 4786-94.
59. Latour, M.G., M. Shinoda, and J.M. Lavoie, *Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats*. Journal of applied physiology., 2001. **90**(1): p. 235.
60. Lemoine, S., et al., *Effect of endurance training on oestrogen receptor alpha expression in different rat skeletal muscle type*. Acta Physiologica Scandinavica, 2002. **175**(3): p. 211-217.
61. Stricker, R., et al., *Establishment of detailed reference values for luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol, and progesterone during different phases of the menstrual cycle on the Abbott ARCHITECT analyzer*.

- Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC, 2006. **44**(7): p. 883-7.
62. Morishima, A., et al., *Aromatase Deficiency in Male and Female Siblings Caused by a Novel Mutation and the Physiological Role of Estrogens*. The Journal of clinical endocrinology & metabolism., 1995. **80**(12): p. 3689.
  63. Lundholm, L., et al., *The estrogen receptor {alpha}-selective agonist propyl pyrazole triol improves glucose tolerance in ob/ob mice; potential molecular mechanisms*. Journal of Endocrinology, 2008. **199**(2): p. 275-286.

## FIGURE LEGENDS

**Table 1.** Sequences of PCR primer for the analysis of selected skeletal muscle mRNAs.

**Table 2.** Absolute and relative (to body weight, BW) mass of skeletal muscles, adipose tissues and various organs. Values are expressed as mean  $\pm$  standard error, n = 8 rats per group. a = p<0.05, aa = p<0.01, aaa = p<0.001 OVX-Inactive vs SHAM-Inactive ; bb = p<0.01, bbb = <0.001 OVX-Active vs OVX-Inactive.

**Table 3.** Non-fasting plasma glucose and insulin concentrations from blood sampled at days 0 and 56. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM, n = 8 rats per group. a = p<0.05 OVX-Inactive vs SHAM-Inactive; b = p<0.05, bbb = p<0.001 OVX-Active vs OVX-Inactive.

**Figure 1.** Body weight gain (A) and daily food intake (B) monitoring over 71 days. The dotted line at day 28 indicates both the time of ovariectomy and start of voluntary physical activity. Values are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), n=8 rats per group. a = p<0.05, aa = p < 0.01; OVX-Inactive vs SHAM-Inactive; b = p<0.01 OVX-Active vs OVX-Inactive.

**Figure 2.** Plasma glucose content (A) and its AUC analysis (B); plasma insulin content (C) and its AUC analysis (D); insulinogenic index (E) and whole-body insulin sensitivity index (F) from blood sampled during an oral glucose tolerance test; and pancreatic insulin content (G). Values are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), n=8 rats per group. a = p<0.05, aa = p<0.01 OVX-Inactive vs SHAM-Inactive; bb = p<0.01 OVX-Active vs OVX-Inactive.

**Figure 3.** Glycogen content in plantaris muscle (A) and liver (B); hepatic triglyceride content (C). Values are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), n=8 rats per group. a = p<0.05, aa p < 0.01 OVX-Inactive vs SHAM-Inactive ; b = p<0.01 OVX-Active vs OVX-Inactive

**Figure 4.** Fold increase in insulin-stimulated glucose uptake (A), basal and insulin-stimulated total Akt protein content (B) and insulin-stimulated fold increase in p-Akt content (C) from labeled 2-DG uptake analysis in soleus muscle. Values are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), n=8 rats per group. a = p<0.05, aa = p < 0.01 OVX-Inactive vs SHAM-Inactive ; b = p<0.01 OVX-Active vs OVX-Inactive.

**Figure 5.** Fold change in gene expression of glucose homeostasis markers in red gastrocnemius muscle from qRT-PCR analysis : Slc2a4 (A), Hk2 (B), Pfkfb3 (C) and Gys1 (D). Values are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), n=8 rats per group. a = p<0.05, aa = p < 0.01 OVX-Inactive vs SHAM-Inactive; b = p<0.01; OVX-Active vs OVX-Inactive.

**Figure 6.** Fold change in gene expression of estrogen function markers in red gastrocnemius muscle from qRT-PCR analysis : Esr1 (A), Esr2 (B), Ncoa1 (C) and Ncor1 (D). Values are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), n=8 rats per group. a =  $p < 0.05$ , aa =  $p < 0.01$  OVX-Inactive vs SHAM-Inactive; b =  $p < 0.01$ ; OVX-Active vs OVX-Inactive

Table 1

Gene (Protein)	Gene ID from NCBI Gene Database	Sense primer (5'-3')	Antisense primer (3'-5')
<i>Esr1 (E<math>\alpha</math>)</i>	24890	cctcccgcttctacagg	tccttggcagactccatgat
<i>Esr2 (E<math>\beta</math>)</i>	25149	caaccagtggtgggagt	catgggactcagatgtaatgactg
<i>Hk2 (Hexokinase II)</i>	25059	cgagtttgaccgagagatcg	cccatgtacatcccgctaata
<i>Gys1 (Glycogen synthase)</i>	690987	gagccatcttgcgactca	ggcaagatggggtctgaag
<i>Pfk<math>\mu</math> (Phosphofructokinase)</i>	65152	tttgaggagccctcacc	tcttctgcaccagatgttcaa
<i>Slc2a4 (GLUT-4)</i>	25139	atcttgatgacgggtgctct	acgatggacacataactcatgg

Table 1. Sequences of PCR primer for the analysis of selected skeletal muscle mRNAs.

Figure 1

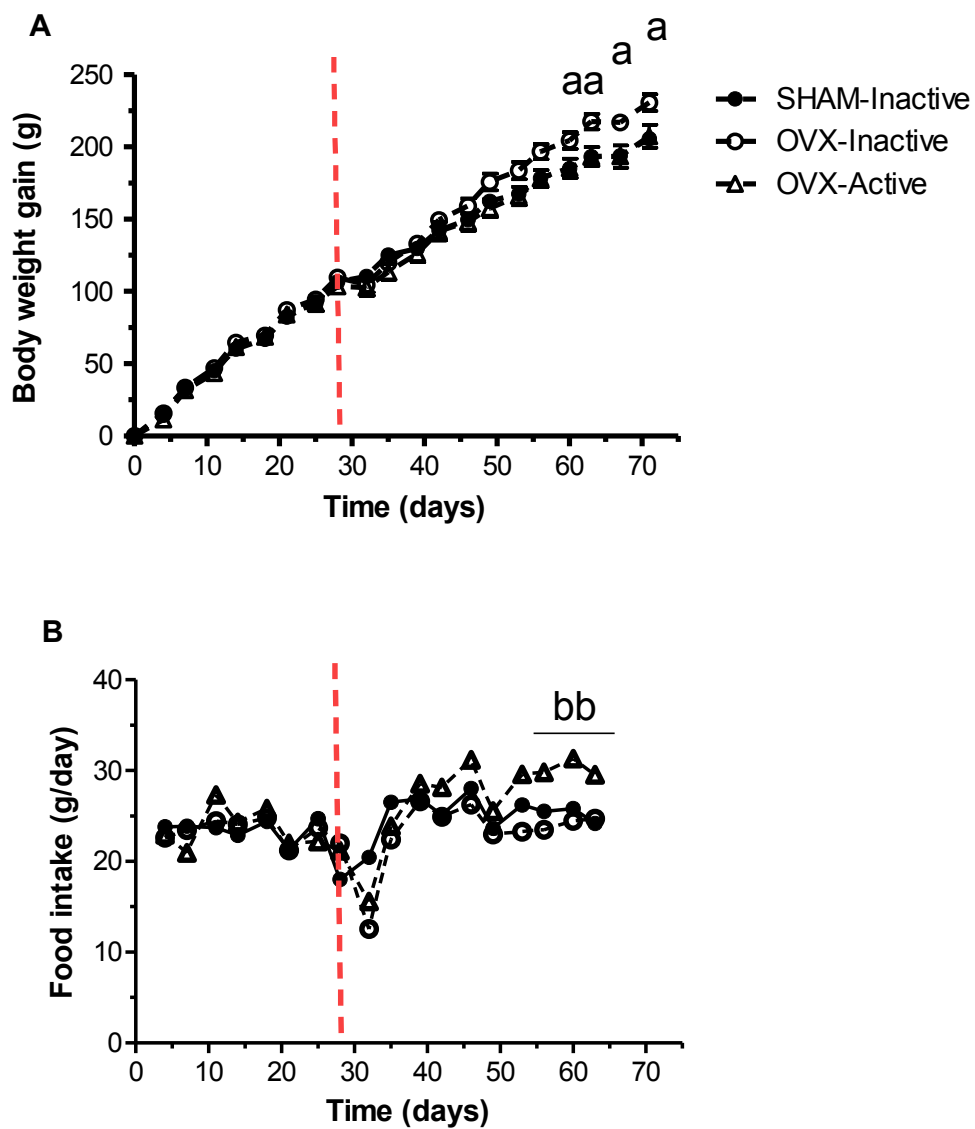




Table 2

Absolute mass	Group		
	SHAM-Inactive (n=8)	OVX-Inactive (n=8)	OVX-Active (n=8)
<i>Skeletal muscle (mg)</i>			
Gastrocnemius	1884 ± 42	2075 ± 33 <sup>aa</sup>	2061 ± 41
Plantaris	411 ± 9	434 ± 11	452 ± 8
Soleus	209 ± 4	222 ± 4	260 ± 7 <sup>bbb</sup>
<i>Adipose tissue (g)</i>			
Abdominal fat	3.49 ± 1.00	3.17 ± 1.88	3.19 ± 1.58
Subcutaneous fat	5.47 ± 0.45	7.46 ± 0.71	5.74 ± 0.52
<i>Other tissues (mg)</i>			
Heart	965 ± 30	1025 ± 24	1081 ± 20
Pancreas	734 ± 39	877 ± 26 <sup>a</sup>	696 ± 30 <sup>bbb</sup>
Uterus	363 ± 37	129 ± 8 <sup>aaa</sup>	146 ± 10
Relative mass	Group		
	SHAM-Inactive (n=8)	OVX-Inactive (n=8)	OVX-Active (n=8)
<i>Skeletal muscle (mg/g BW)</i>			
Gastrocnemius	4.95 ± 0.11	5.16 ± 0.11	5.34 ± 0.11
Plantaris	1.08 ± 0.02	1.10 ± 0.02	1.18 ± 0.03
Soleus	0.55 ± 0.01	0.55 ± 0.01	0.67 ± 0.02 <sup>bbb</sup>
<i>Adipose tissue (mg/g BW)</i>			
Abdominal fat	91.52 ± 2.07	82.09 ± 1.99 <sup>aa</sup>	84.35 ± 1.51
Subcutaneous fat	14.45 ± 1.31	18.49 ± 1.63	14.92 ± 1.32
<i>Other tissues (mg/g BW)</i>			
Heart	2.53 ± 0.05	2.55 ± 0.05	2.81 ± 0.06 <sup>bb</sup>
Pancreas	1.93 ± 0.10	2.18 ± 0.09	1.83 ± 0.12
Uterus	0.95 ± 0.08	0.32 ± 0.02 <sup>aaa</sup>	0.38 ± 0.03

Table 3

Non-fasting blood parameters	Group		
	SHAM-Inactive (n=8)	OVX-Inactive (n=8)	OVX-Active (n=8)
<i>Plasma glucose (mg/dL)</i>			
Day 0	136.63 ± 4.35	138.25 ± 2.86	140.50 ± 3.84
Day 56	158.87 ± 6.52	198.37 ± 9.85 <sup>a</sup>	144.38 ± 5.42 <sup>bbb</sup>
<i>Plasma insulin (ng/dL)</i>			
Day 0	9.68 ± 0.52	11.17 ± 0.72	10.84 ± 0.86
Day 56	15.81 ± 0.64	16.77 ± 0.79	12.51 ± 0.73 <sup>b</sup>

Figure 2

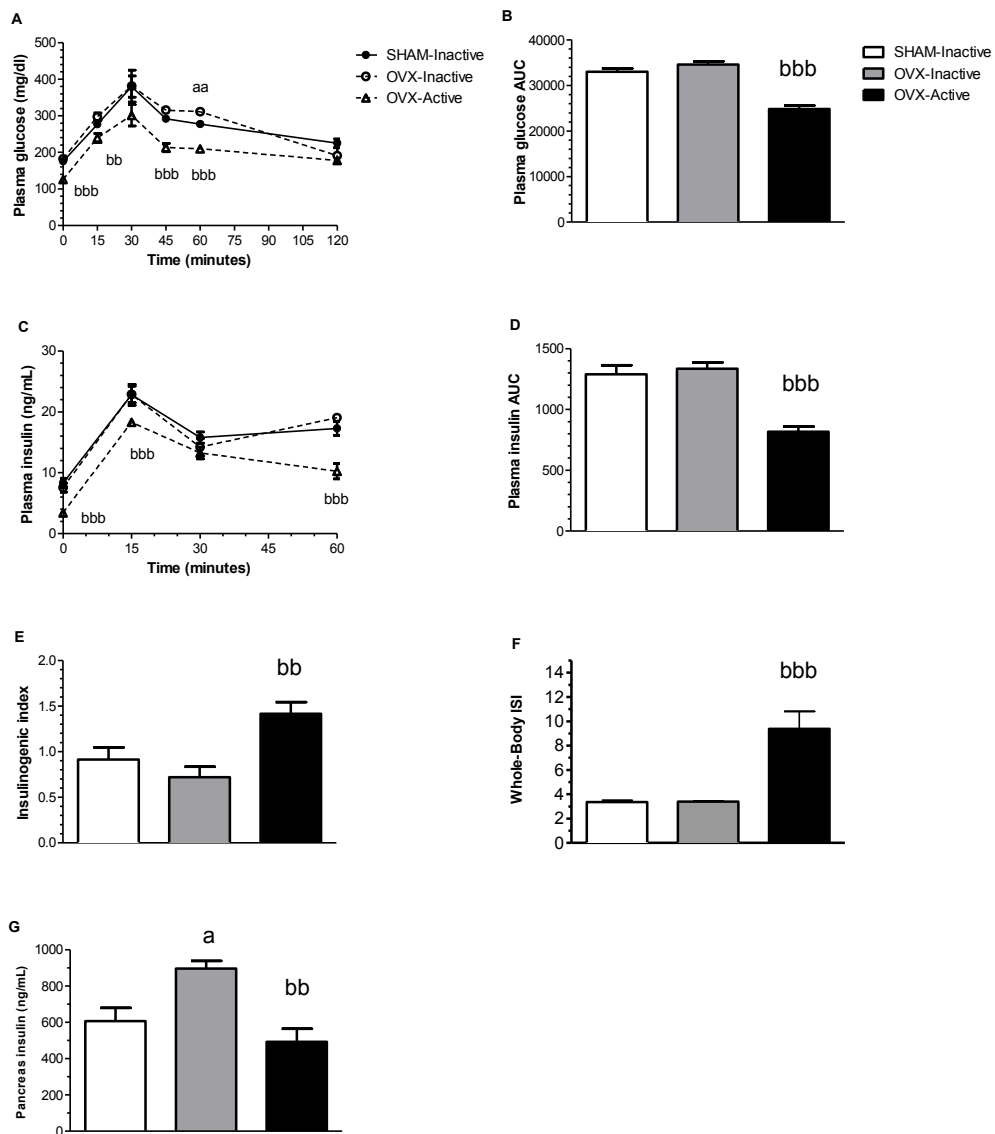


Figure 3

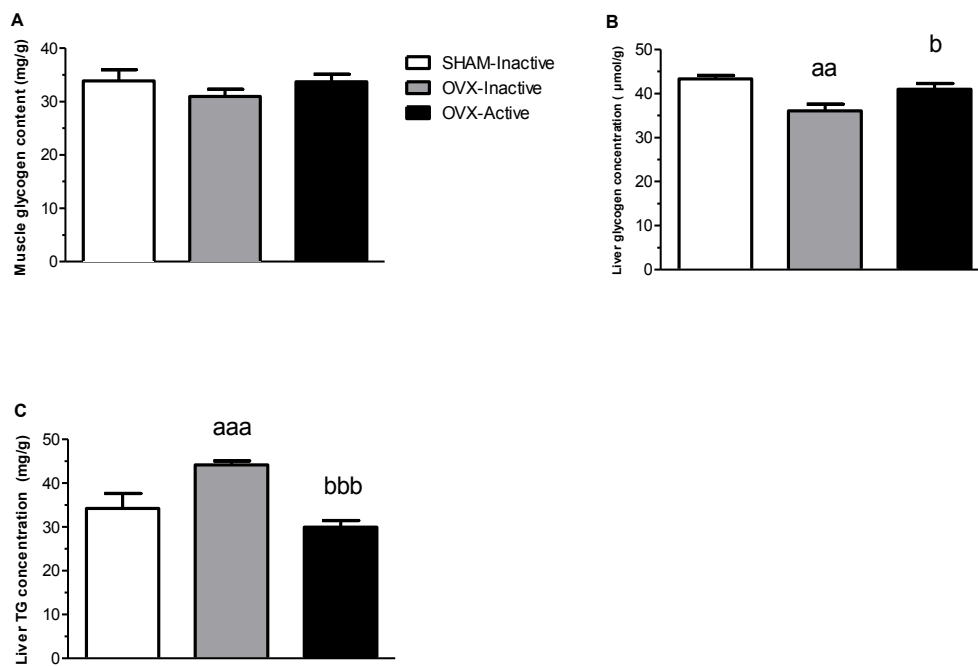


Figure 4

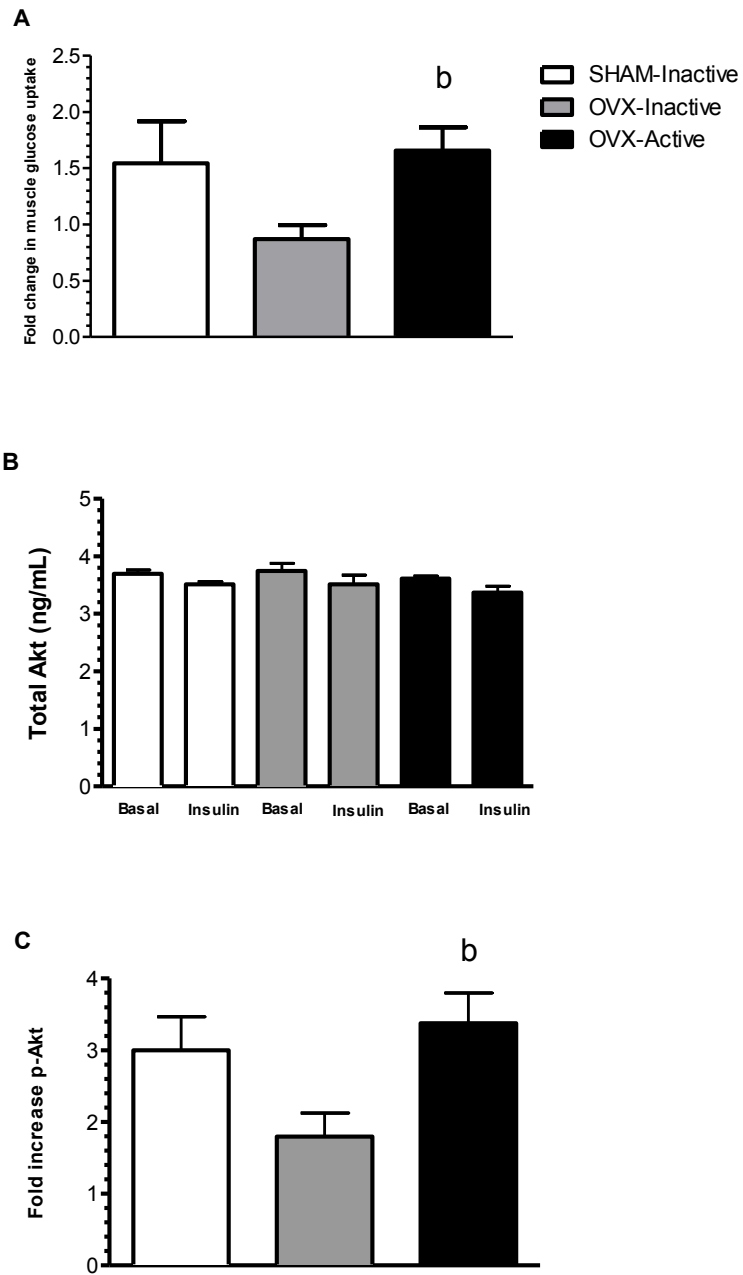


Figure 5

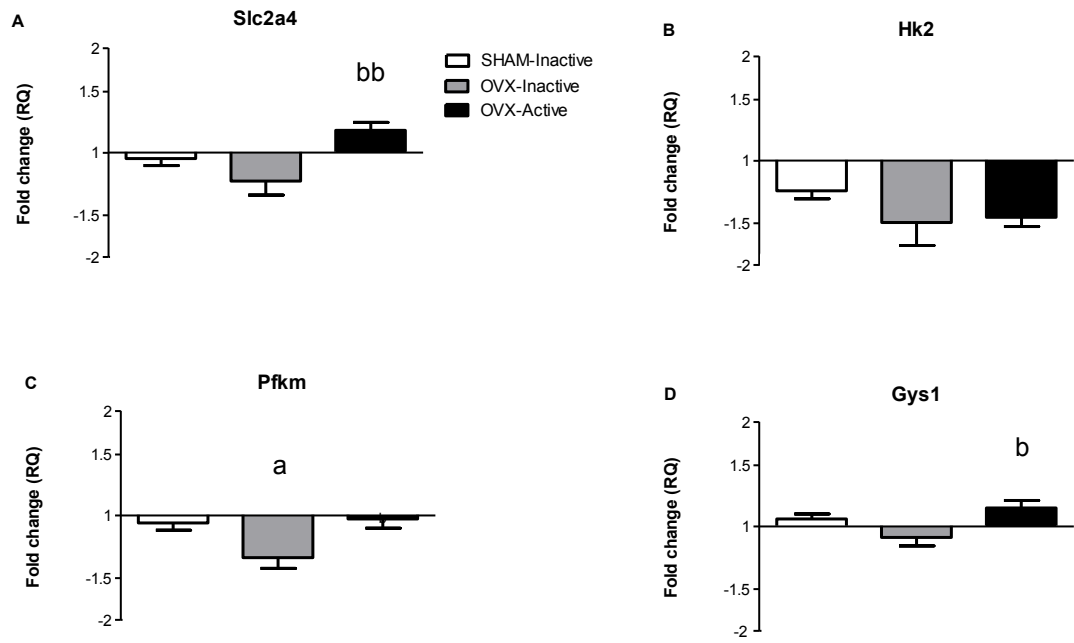
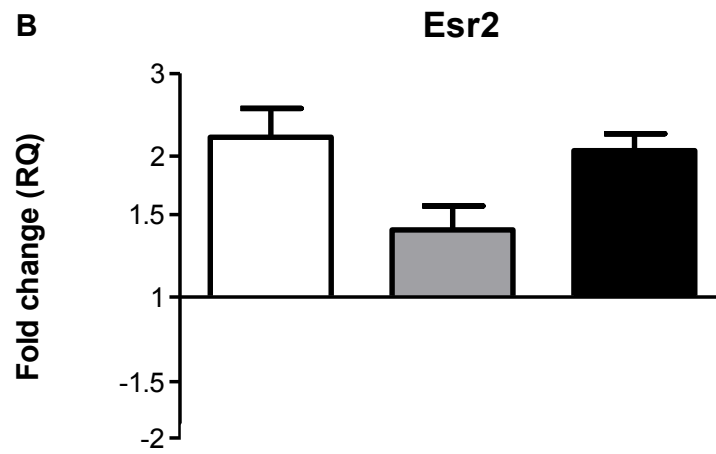
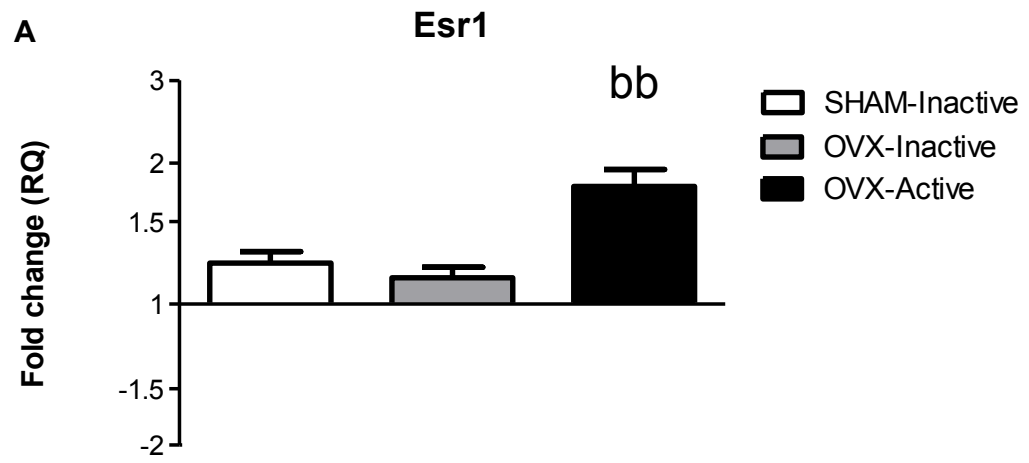


Figure 6



## 6 Retour sur l'article et discussion

### 6.1 Résultats de l'étude

Jusqu'à présent, les études touchant le rôle possiblement protecteur des œstrogènes ovariens dans la pathogénèse du DT2 chez les rats femelles ont été effectuées sur des rates Sprague-Dawley et Wistar. Parce qu'elles ne s'agissent pas de modèles diabétiques cependant, il va de soi que ces variétés de rat ne conviennent pas à l'objectif visé par notre travail d'étudier la possible influence ou non des estrogènes ovariens sur le développement du DT2. Le présent projet avait pour objectif spécifique d'étudier, dans un contexte de développement du DT2, les effets de 1) l'ablation chirurgicale des ovaires (ovariectomie) et 2) de l'entraînement volontaire à la course suite à l'ovariectomie sur l'homéostasie du glucose chez les rats ZDF (Zucker diabétiques et obèses) femelles, un modèle animal bien connu de DT2. La description ainsi qu'une discussion détaillées des résultats de l'étude peuvent être lues dans l'article ci-joint à la section précédente. En résumé, les résultats de cette étude suggèrent que l'ovariectomie détériore l'homéostasie du glucose des rates ZDF femelles en affectant le contrôle glycémique et la captation musculaire de glucose stimulée par insuline. Malgré cela, et contrairement à ce qui était attendu au départ, nous n'avons pas observé de développement du DT2 par l'ovariectomie, c'est-à-dire tel que caractérisé par une glycémie dépassant les 200 mg/dL à n'importe quel moment de la journée (lire la section 1.3 pour plus de détails) [122]. Pour sa part, l'activité physique a amélioré l'homéostasie du glucose des rates ZDF femelles ovariectomies en améliorant le contrôle glycémique, la tolérance au glucose et la captation musculaire de glucose stimulée par insuline.

L'ovariectomie a d'abord favorisé un gain accru de poids corporel dans le temps, malgré une prise alimentaire semblable entre les groupes SHAM-Inactive et OVX-Inactive. Par contre, une plus grande consommation alimentaire fut observée avec le groupe OVX-Active pour un gain de poids corporel moindre que celui du groupe OVX-Inactive. L'étude de Smith et al. indique que l'activité physique permet



d'améliorer la composition corporelle chez les rates ZDF [45]. Nos résultats suggèrent que cela est possible même après une ovariectomie. En dépit des changements constatés au niveau du gain de poids corporel suivant les interventions, aucune différence significative de masse adipeuse intra-abdominale ne fut observée entre les groupes. Dans son étude sur les rates Wistar, Zoth et al. [38] ont observé que les animaux ovariectomisés étaient davantage susceptibles à l'obésité. De son côté, Saengsirisuwan et al. [37] ont constaté que les rates Sprague-Dawley avaient gagné plus de poids avec l'ovariectomie lors de l'étude en plus d'avoir une plus grande adiposité viscérale. Pour ces deux études comme pour la nôtre, l'activité physique semble avoir contré l'obésité survenue suite à l'ovariectomie [37, 38].

Le contrôle glycémique fut également affecté par l'ovariectomie. En effet, la glycémie à l'état nourri du groupe OVX-Inactive au jour 56 (post-ovariectomie) était significativement plus élevée que celle du groupe SHAM-Inactive alors que le contenu pancréatique en insuline augmenta de façon marquée avec l'ovariectomie; indiquant ainsi que le pancréas était en surcompensation insulinémique chez les rates du groupe OVX-Inactive par rapport au groupe SHAM-Inactive. De plus, le contenu hépatique en glycogène fut diminué pour le groupe OVX-Inactive, témoignant de l'effet négatif de l'ovariectomie sur la capacité du tissu hépatique à prendre en charge le glucose circulant dans le sang afin de le stocker sous forme de glycogène. Malgré un ensemble de résultats suggérant une altération du contrôle glycémique par l'ovariectomie, il semble que cette dernière n'ait pas généré un contrôle glycémique aussi problématique que celui rapporté chez les rats ZDF mâles d'un âge semblable dans la littérature, comme on serait en droit de s'attendre en se basant sur notre première hypothèse de travail. À titre d'exemple, la glycémie et l'insulinémie des rats ZDF mâles avoisinent 400 mg/dL et 3-6 ng/mL respectivement à l'âge de 13-14 semaines [123, 124]. Or, à l'âge de 13 semaines (post-ovariectomie), la glycémie des rates OVX-Inactive de notre étude approchait (mais ne dépassait pas) les 200 mg/dL tout au plus. En dépit de l'ovariectomie, l'entraînement volontaire a eu un effet positif sur le contrôle glycémique des rates ZDF. À l'instar des observations des rates

Wistar femelles ovariectomisées dans l'étude de Zoth et al. [38], la glycémie à l'état nourri aux jours 42 et 56 (post-ovariectomie) des rates ZDF ovariectomisées fut plus basse avec l'entraînement que celle des rates ovariectomisées non-entraînées. Il en fut de même pour l'insulinémie à l'état nourri au jour 56 ainsi que pour le contenu en insuline dans le pancréas. La quantité de glycogène dans le foie fut aussi augmentée avec l'activité physique.

Même si de précédentes études animales et humaines [50, 67, 68, 71, 125, 126] ont démontré un lien entre déficit d'œstrogènes et résistance à l'insuline ou intolérance au glucose, les résultats obtenus à partir de l'OGTT dans notre étude n'indiquent pas de changement significatif de tolérance au glucose ou de sensibilité à l'insuline suite à l'ovariectomie, tel que démontré par les indices insulinogénique (IGI – calculé comme étant le rapport entre l'augmentation de l'insulinémie et celle de la glycémie pour les 30 minutes suivant l'ingestion de glucose, marqueur de la capacité à sécréter l'insuline [127-130]) et de sensibilité à l'insuline (WBISI). Ce manque apparent d'effet de l'ovariectomie sur la tolérance au glucose ainsi que sur la sensibilité à l'insuline alors que le contrôle glycémique est altéré peut paraître paradoxal. Toutefois, le contrôle glycémique, la tolérance au glucose ainsi que la sensibilité à l'insuline constituent des paramètres « macroscopiques » de l'homéostasie du glucose. Or, comme une pathologie telle que le DT2 se développe dans la durée en commençant par des altérations au niveau moléculaire ou cellulaire, l'apparition de « symptômes macroscopiques » peut bien ne survenir que de façon graduelle ou partielle, privilégiant un paramètre sur un autre. Comme il sera discuté dans le prochain paragraphe, l'ovariectomie a affecté divers marqueurs moléculaires et cellulaires de l'homéostasie du glucose. Cependant, le test oral de tolérance au glucose (OGTT) a révélé une grande amélioration de la réponse insulinémique et de la sensibilité à l'insuline dans le groupe OVX-Active par rapport aux deux autres groupes, tel qu'indiqué respectivement par l'indice insulinogénique (IGI) et l'indice corporel de sensibilité à l'insuline (WBISI). Nos résultats concernant l'effet de l'entraînement sur la sensibilité et la réponse à l'insuline sont à l'image des études de

Saengsirisuwan et al. [37] sur les rates Sprague-Dawley ovariectomisées ainsi que de Smith et al. [45] portant sur les rates ZDF.

Par ailleurs, la captation insulino-dépendante de glucose par le muscle fut légèrement réduite par l'ovariectomie (n.s.;  $p=0,168$ ). Parallèlement, l'expression génétique des marqueurs suivants du métabolisme cellulaire du glucose, phosphofruktokinase ( $p<0,05$ ), hexokinase II, glycogène synthétase, GLUT4 (tous n.s.) semble avoir été affectée négativement chez les rates OVX-Inactive. Ces évidences suggèrent que la perte d'oestrogènes peut possiblement altérer l'expression de marqueurs des voies de disposition cellulaire du glucose soit le transport, la glycolyse et la glycogénèse chez les rates ZDF. Cette légère propension générale à la détérioration de l'expression de marqueurs du métabolisme glucidique musculaire n'était pas aussi marquée que celle rapportée chez les rats ZDF mâles d'un âge semblable (détails dans l'article ci-joint). En dépit du retrait des ovaires, la captation insulino-dépendante du glucose par le muscle squelettique fut normalisée par l'activité physique, en concordance avec l'augmentation de l'expression génétique du transporteur de glucose GLUT-4. L'activité physique influença aussi positivement l'expression génétique des enzymes phosphofruktokinase et glycogène synthétase dans le muscle squelettique. Des observations semblables furent également rapportées par Saengsirisuwan et al. [37] qui avaient observé que les rates Sprague-Dawley ovariectomisées virent leur captation insulino-dépendante de glucose par le muscle s'améliorer avec l'activité physique. Cette amélioration de la prise insulino-dépendante de glucose du muscle découlant de l'activité physique volontaire chez les rates ZDF ovariectomisées est tout-à-fait cohérente avec les améliorations observées au plan du contrôle glycémique, de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline dans notre étude. Par ailleurs, la masse musculaire constitue un site important de disposition du glucose (par stockage ou oxydation). Quoique le stockage et l'oxydation musculaires du glucose n'ont pas été mesurés directement dans la présente étude, nos données suggèrent une meilleure prise musculaire du glucose, signifiant le retrait de celui-ci de la circulation sanguine, d'où un meilleur contrôle glycémique.

Bien qu'ayant probablement une influence négative sur l'étiologie du DT2, les altérations de divers paramètres de l'homéostasie du glucose occasionnées par l'ovariectomie des rats ZDF femelles ne résultent pas en une manifestation diabétogène comme celle observée chez des rats ZDF mâles du même âge (ex. : glycémie journalière ne dépassant pas les 200 mg/dL). Par contre, l'activité physique volontaire a eu un effet bénéfique sur l'ensemble des composants de l'homéostasie du glucose chez les rates ZDF ovariectomisées, ce qui indique que l'homéostasie du glucose peut donc être atténuée par la pratique d'activité physique volontaire malgré la perte d'œstrogènes suscitée par l'ovariectomie chez les rates ZDF.

## 6.2 Rôle possible ER $\alpha$ et ER $\beta$

La perte d'œstrogènes ovariens due à l'ovariectomie a négativement affecté le contrôle glycémique chez nos rates ZDF. Outre la présence ou non d'œstrogène dans l'organisme, la sensibilité des tissus concernés par l'homéostasie du glucose aux effets des œstrogènes doit être également prise en considération. Un indicateur possible de l'action cellulaire des œstrogènes est l'expression de ses récepteurs au niveau tissulaire. Notre étude révèle que l'ovariectomie n'a pas eu d'effet négatif significatif sur leur expression génétique au niveau du muscle gastrocnémien rouge, même s'il a été rapporté que l'ovariectomie pouvait diminuer l'expression génétique et protéique des récepteurs à œstrogènes dans le tissu hépatique [131]. Il est donc possible qu'une baisse d'expression génétique des récepteurs à œstrogène par ovariectomie dans d'autres tissus tels que le pancréas, le foie et le tissu adipeux puisse avoir eu un rôle à jouer dans la détérioration du profil métabolique des rates OVX-Inactive, bien que les données actuelles ne nous permettent pas de conclure à ce sujet.

Malgré l'effet non-significatif de l'ovariectomie, l'activité physique chez les rates OVX était associée à une augmentation significative de l'expression du récepteur ER $\alpha$  dans le gastrocnémien rouge. La question de la sensibilité des tissus à l'action

des œstrogènes est pertinente dans la mesure où l'élimination des œstrogènes chez les animaux ovariectomisés ou suivant la ménopause n'est pas complète [47]. Il a déjà été expliqué plus tôt dans ce mémoire que les glandes surrénaliennes constituent un site mineur de production d'œstrogènes. Ces œstrogènes, produites de manière résiduelle, peuvent donc continuer à agir sur les tissus via leurs récepteurs malgré la dégradation des follicules ovariens. Il est alors possible que l'activité physique fasse en sorte d'augmenter la sensibilité du tissu à l'action des œstrogènes résiduelles, tel que suggéré par l'augmentation de l'expression musculaire du récepteur ER $\alpha$ , un régulateur positif de la sensibilité musculaire à l'insuline (le lecteur est invité à lire les revues de littérature sur le rôle de récepteurs à estrogènes suivantes à cet effet : [49] et [50]). En effet, Gorres et al. [132] ont récemment observé que l'activation de ER $\alpha$  avait amélioré le transport du glucose dans le muscle squelettique chez des rates Sprague-Dawley ovariectomisées alors que l'activation simultanée de ER $\alpha$  et ER $\beta$  n'a pas eu d'effet. Il fut suggéré que les œstrogènes activent préférentiellement le récepteur ER $\alpha$  par rapport au récepteur ER $\beta$  au niveau du muscle squelettique pour y médier leurs effets sur l'homéostasie du glucose [132]. L'activation préférentielle de ER $\alpha$  par rapport à ER $\beta$  dans le muscle squelettique par les estrogènes se révèle être de bonne augure pour l'homéostasie musculaire du glucose, dans la mesure où l'activation de ER $\beta$  agit négativement sur ce paramètre [50].

Tel que mentionné dans l'article ci-joint, les femmes post-ménopausées produisent des quantités d'œstrogènes comparables à celles des hommes adultes [13]. Or, même chez ces derniers qui ne produisent qu'une fraction de la quantité d'œstrogènes produite par les femmes adultes non-ménopausées, une déficience en œstrogènes causée par une mutation du gène codant pour l'enzyme aromatasase ou même une perte de sensibilité à l'action des œstrogènes causée par une mutation du gène codant pour ER $\alpha$  résulte en insulino-résistance [68, 69] suggérant ainsi le rôle important des estrogènes et du récepteur ER $\alpha$  dans l'homéostasie. Ces évidences suggèrent que de faibles concentrations d'œstrogènes, tel qu'observées chez l'homme, sont suffisantes pour avoir des actions biologiques. Il est ainsi plausible que les œstrogènes, en

concentrations résiduelles chez des animaux ovariectomisés, puissent être impliqués dans l'augmentation de la prise insulino-dépendante de glucose chez les rates OVX-Active si l'action des oestrogènes est améliorée par une signalisation accrue au niveau des cellulaires musculaire tel que pourrait le suggérer l'élévation des l'expression génétique d'ER $\alpha$ .

### 6.3 Limites de l'étude

#### 6.3.1 L'ovariectomie comme modèle animal de ménopause

L'ovariectomie constitue un modèle animal fort bien établi de ménopause dans le domaine de la recherche sur le vieillissement [47]. En effet, l'ovariectomie chez les rongeurs est analogue à la ménopause chirurgicalement induite chez les femmes (ex. : hystérectomie) et permet de mettre en lumière l'influence des œstrogènes sur nombre de paramètres et réponses biologiques, physiologiques et métaboliques. Deux problèmes entourant l'ovariectomie l'empêchent toutefois de simuler pleinement la ménopause humaine [47]. Premièrement, et comme expliqué précédemment dans ce travail, la ménopause chez les femmes est un processus graduel s'étalant sur plusieurs années. Or, une vingtaine de minutes ont suffi à ovariectomiser une rate ZDF dans notre étude, de telle sorte que la cessation de la production ovarienne d'œstrogènes fut abrupte. Dans un deuxième temps, l'ovariectomie fait diminuer la production de plusieurs hormones autres que les œstrogènes, telles que l'hormone lutéinisante (LH), l'hormone relâchante de la gonatrophine (GnRH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH). Parce qu'elles régulent elles-mêmes les œstrogènes d'un point de vue central, ces hormones peuvent également jouer un rôle important dans la ménopause ainsi que dans la régulation de plusieurs processus dans le système nerveux central (ex. : régulation de l'appétit).

### 6.3.2 Le moment choisi pour l'ovariectomie et durée de l'étude

Avec l'apport d'une diète spéciale riche en lipides (Purina 5008) [30], les rates ZDF développent le DT2 vers l'âge de 10-12 semaines. L'objectif premier de notre étude étant d'étudier l'effet de l'ovariectomie sur la pathogénèse du DT2, il importait de choisir le moment approprié pour procéder à l'ovariectomie des rates ZDF. En effet, l'ovariectomie devait être effectuée *au moment de la transition* d'un état pré-diabétique vers un état diabétique. En se basant sur l'étude de Yoshioka et al. [133] ainsi que sur les informations techniques concernant le rat ZDF en tant que modèle animal de DT2 [123, 124], les ovariectomies furent effectuées quand les rates étaient âgées d'un peu moins de 10 semaines (jour 28 de l'étude). Même si ce choix élimine les inconvénients d'une ovariectomie trop hâtive (du genre adaptation), il aurait été possible d'explorer d'autres moments d'intervention afin d'optimiser le devis expérimental. L'étude s'est étendue sur 6 semaines suite à l'ovariectomie des rates. Pour plusieurs paramètres progressant avec le passage du temps, un effet modeste, mais réel de l'ovariectomie fut observé à la toute fin de l'étude. Il est alors tentant de penser qu'une durée d'étude plus longue aurait pu révéler des différences plus marquées entre les divers groupes expérimentaux.

### 6.3.3 Mesure de l'activité physique

Les rates ZDF du groupe expérimental OVX-Active ont suivi un programme d'entraînement volontaire à la course dans une roue constituant la totalité de l'espace d'hébergement des rates, contrairement aux cages à roue standard utilisées en temps normal. Les « cages-roues » utilisées dans la présente étude étaient reliées à un système informatisé permettant la mesure continue de la distance parcourue. Une telle procédure est une façon très commune d'évaluer le niveau d'activité physique lors d'études effectuées avec les rongeurs [107, 134, 135]. Il appert néanmoins qu'une mesure de l'activité physique spontanée, autre que la course, pour toutes les rates aurait sans doute permis de brosser un portrait plus complet du niveau d'activité physique global au sein des divers groupes étudiés dans ce travail car la relation entre

la prise alimentaire, l'activité physique mesurée dans la roue et la composition corporelle demeure relativement partielle. À cet effet, il existe des cages dotées de dispositifs télémétriques capables de détecter et de comptabiliser les moindres mouvements de l'animal à l'intérieur de l'espace d'hébergement. Ce matériel onéreux n'étaient pas disponible pour notre étude. De plus, contrairement aux cages standard munies d'une roue, il est probable que la portion d'activité physique autre que la course dans la « cage-roue » par rapport à l'activité physique totale (hébergement + course) soit plus faible dans notre système comparativement à un système commercial.

#### 6.3.4 Mesure de l'expression génétique

L'expression génétique d'un certain nombre de marqueurs du métabolisme musculaire du glucose (GLUT-1, HK-2, PFKM et GS) et de la fonction des œstrogènes ( $ER\alpha$  et  $ER\beta$ ) fut mesurée en employant la technique du PCR en temps réel (qRT-PCR). Basée sur une réaction enzymologique, la PCR et sur la mesure en continu de son produit, la réaction en chaîne par polymérase en temps réel est une technique communément utilisée dans le but de quantifier l'ARNm dans un tissu donné par amplification (le muscle gastrocnémien rouge dans le cas présent). La mesure de l'expression génétique du gène-cible (représenté par l'ARNm) a démontré sa grande utilité pour déterminer de façon rapide et efficace la modification d'expression d'un gène-cible causée par l'intervention expérimentale. Toutefois, l'expression génétique d'un gène-cible ne reflète pas toujours fidèlement sa traduction en protéine-cible. En effet, il se peut qu'un gène soit présent dans un tissu donné sans que la protéine correspondante y soit produite. Il se peut également que l'amplitude de l'expression protéique soit supérieure ou inférieure à ce que l'expression génétique peut laisser supposer. Ultimement une confirmation des effets de l'intervention au niveau du contenu protéique du gène-cible est souhaitable, la technique du Western Blot, considérée comme la norme pour évaluer l'expression protéique, s'avère souvent longue et techniquement hasardeuse quand il y a un manque d'expérience. Ainsi, quoiqu'intéressants, les résultats de notre étude



concernant marqueurs du métabolisme musculaire du glucose et de la fonction des œstrogènes doivent être considérées avec toute la prudence qu'oblige l'interprétation de données se rapportant à l'expression génétique.

## 7 Conclusion

Environ 10 % des femmes adultes américaines, totalisant 11 millions d'individus, sont diabétiques. La population vieillissant rapidement, l'étude des impacts sur la santé de la perte d'œstrogènes encourus avec la ménopause revêt un grand intérêt pour les femmes, tant symptomatiques qu'en parfaite santé. Le présent travail visait donc à répondre à deux questions 1) la perte d'œstrogènes encourue à la ménopause précipite-t-elle la pathogénèse du DT2 ? 2) l'activité physique peut-elle contrer ces possibles effets ? Les études humaines portant sur la ménopause, la HRT et les phénotypes aromatase/ER $\alpha$ -déficientes suggèrent qu'une déficience en œstrogènes ou de leur fonction augmente les risques de DT2; elle influence aussi négativement l'homéostasie du glucose via des altérations de la composition corporelle (adiposité et obésité) et du contrôle glycémique en altérant la sensibilité à l'insuline. Les études animales impliquant des souris aux phénotypes aromatase/ER $\alpha$ -déficientes, des rates ovariectomisées ainsi que des rates ZDF confirment les observations chez les humains. De plus, ces travaux suggèrent qu'une déficience en œstrogènes altère la sensibilité à l'insuline, le transport et le métabolisme musculaires du glucose alors que la fonction  $\beta$ -pancréatique s'en trouve également affectée. En plus de voir leur homéostasie du glucose se dégrader et leurs risques de DT2 augmenter à la ménopause, les femmes post-ménopausées sont davantage sédentaires que leurs consœurs pré-ménopausées. Or, l'inactivité physique constitue un facteur de risque majeur pour le DT2 ainsi qu'une foule de problèmes de santé. La pratique d'activité physique est bénéfique sur plusieurs plans. Plusieurs études humaines et animales démontrent qu'elle atténue les changements négatifs de composition corporelle associés à la ménopause et améliore l'homéostasie générale, musculaire et pancréatique du glucose. Ainsi, notre étude a montré que le déficit d'œstrogène, occasionnée par l'ovariectomie, a un impact négatif sur l'homéostasie du glucose chez les rates ZDF âgées de 10 semaines. En effet, le contrôle glycémique, la captation du glucose ainsi que possiblement son métabolisme au niveau musculaire furent négativement affectés par la perte d'œstrogènes. Toutefois, les résultats obtenus à partir de l'OGTT n'indiquèrent pas de changement significatif de tolérance au glucose ou de sensibilité à l'insuline suite à l'ovariectomie. Réflétant l'impact

positif de l'activité physique volontaire sur la réponse insulinémique et la sensibilité à l'insuline malgré un déficit en oestrogène, le contrôle glycémique et la captation insulino-dépendante de glucose musculaire ont été améliorés de façon marquée. Les résultats de cette présente étude suggèrent que la perte d'oestrogènes ovariens peut altérer négativement l'homéostasie glucose chez les rats ZDF femelles, même si le diabète de type 2 n'est pas provoqué; alors que l'activité physique en améliore l'homéostasie du glucose en dépit du déficit en oestrogènes.

## Bibliographie

1. United Nations. Department of, E. and D. Social Affairs. Population, *World population ageing 1950-2050*. 2002, New York: United Nations.
2. Statistics Canada. Demography, D. *Population projections for Canada, provinces and territories, 2009 to 2036*. 2010; Available from: <http://www.publications.gc.ca/pub?id=334433&sl=0>.
3. Centers for Disease, C. and Prevention. *National diabetes fact sheet, 2007*. 2008; Available from: [http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/pdf/ndfs\\_2007.pdf](http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/pdf/ndfs_2007.pdf).
4. Szmuiłowicz, E.D., C.A. Stuenkel, and E.W. Seely, *Influence of menopause on diabetes and diabetes risk*. *Nat Rev Endocrinol*, 2009. **5**(9): p. 553-558.
5. Maltais, M.L., J. Desroches, and I.J. Dionne, *Changes in muscle mass and strength after menopause*. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 2009. **9**(4): p. 186-97.
6. Lara, S., G. Casanova, and P.M. Spritzer, *Influence of habitual physical activity on body composition, fat distribution and metabolic variables in early postmenopausal women receiving hormonal therapy*. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. **In Press, Corrected Proof**.
7. Hawley, J.A. and J.R. Zierath, *Physical activity and type 2 diabetes : therapeutic effects and mechanisms of action*. 2008, Champaign, IL: Human Kinetics.
8. Asikainen, T.-M., K. Kukkonen-Harjula, and S. Miilunpalo, *Exercise for Health for Early Postmenopausal Women: A Systematic Review of Randomised Controlled Trials*. *Sports Medicine*, 2004. **34**(11): p. 753-778.
9. Sternfeld, B., et al., *Menopause, physical activity, and body composition/fat distribution in midlife women*. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 2005. **37**(7): p. 1195-202.
10. Soules, M.R., et al., *Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW)*. *Fertility and Sterility*, 2001. **76**(5): p. 874-8.
11. Nelson, H.D., *Menopause*. *Lancet*, 2008. **371**(9614): p. 760-70.
12. Williams, R.H., P.R. Larsen, and M.D.C. LLC. *Williams textbook of endocrinology*. 2003; Available from: <http://uclibs.org/PID/31542>.
13. Stricker, R., et al., *Establishment of detailed reference values for luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol, and progesterone during different phases of the menstrual cycle on the Abbott ARCHITECT analyzer*. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*, 2006. **44**(7): p. 883-7.
14. Meyer, M.R., et al., *Obesity, insulin resistance and diabetes: sex differences and role of oestrogen receptors*. *Acta Physiologica*, 2011: p. no-no.
15. Hakim, N.S., *Pancreas, islet and stem cell transplantation for diabetes*. 2010, Oxford; New York: Oxford University Press, USA.
16. Puglianiello, A. and S. Cianfarani, *Central control of glucose homeostasis. The review of diabetic studies : RDS*, 2006. **3**(2): p. 54-60.
17. Thorens, B., *Central control of glucose homeostasis: the brain--endocrine pancreas axis*. *Diabetes & Metabolism*, 2010. **36**: p. 45-9.

18. DeFronzo, R.A., *Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. The Medical clinics of North America, 2004. **88**(4): p. 787-835.
19. Andrali, S.S., et al., *Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells*. Biochem. J. Biochemical Journal, 2008. **415**(1): p. 1-10.
20. Taniguchi, C.M., B. Emanuelli, and C.R. Kahn, *Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action*. Nature reviews. Molecular cell biology., 2006. **7**(2): p. 85.
21. Bolster, D.R., L.S. Jefferson, and S.R. Kimball, *Regulation of protein synthesis associated with skeletal muscle hypertrophy by insulin-, amino acid- and exercise-induced signalling*. The Proceedings of the Nutrition Society, 2004. **63**(2): p. 351-6.
22. Lei, X.q., et al., *Advance in the Nutrition and Physiological Function of Arginine*. Zhongguo xu mu za zhi = Chinese animal husbandry., 2009. **45**(3): p. 46-49.
23. International Diabetes, F. *Global guideline for type 2 diabetes*. 2005; Available from: <http://library.imf.org/Restricted/docs/IDF%5FGlobalGuidelineForType2Diabetes.pdf>.
24. DeFronzo, R.A. and D. Tripathy, *Skeletal Muscle Insulin Resistance Is the Primary Defect in Type 2 Diabetes*. Diabetes Care, 2009. **32**(suppl 2): p. S157-S163.
25. Abdul-Ghani, M.A. and R.A. DeFronzo, *Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle*. Journal of Biomedicine & Biotechnology, 2010. **2010**.
26. Felber, J.P., et al., *Regulation of glucose storage in obesity and diabetes: metabolic aspects*. Diabetes/Metabolism Reviews, 1988. **4**(7): p. 691-700.
27. American College of Endocrinology Task Force on the Prevention of, D., *Diagnosis and Management of Prediabetes in the Continuum of Hyperglycemia-When Do the Risks of Diabetes Begin? A Consensus Statement From the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. Endocrine Practice, 2008. **14**(7): p. 933-946.
28. ADA. *Prediabetes*. Diabetes basics 2011 [cited 2011 26-01-2011].
29. Canadian Diabetes, A., *Canadian Diabetes Association 2008 clinical practice guidelines for the prevention and management of diabetes in Canada*. 2008, Toronto, Ont.: Canadian Diabetes Association.
30. American Diabetes, A., *American Diabetes Association complete guide to diabetes*. 2005, Alexandria, VA: American Diabetes Association.
31. World Health Organization. Department of Noncommunicable Disease, S., *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications : report of a WHO consultation. Part 1, Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. 1999.
32. Wegener, G. and U. Krause, *Different modes of activating phosphofructokinase, a key regulatory enzyme of glycolysis, in working vertebrate muscle*. Biochemical Society Transactions, 2002. **30**(2): p. 264-70.
33. Graham, T.E., et al., *The regulation of muscle glycogen: the granule and its proteins*. Acta physiologica (Oxford, England), 2010. **199**(4): p. 489-98.

34. Elayat, A.A., M.M. el-Naggar, and M. Tahir, *An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets*. Journal of Anatomy, 1995. **186**: p. 629-37.
35. Lundholm, L., et al., *The estrogen receptor {alpha}-selective agonist propyl pyrazole triol improves glucose tolerance in ob/ob mice; potential molecular mechanisms*. Journal of Endocrinology, 2008. **199**(2): p. 275-286.
36. Li, L., et al., *Mitochondrial biogenesis and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma; coactivator-alpha; (PGC-1alpha1;) deacetylation by physical activity: Intact adipocytokine signaling is required*. Diabetes Diabetes, 2011. **60**(1): p. 157-167.
37. Saengsirisuwan, V., et al., *Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement*. Metabolism, 2009. **58**(1): p. 38-47.
38. Zoth, N., et al., *Physical activity and estrogen treatment reduce visceral body fat and serum levels of leptin in an additive manner in a diet induced animal model of obesity*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. **In Press, Uncorrected Proof**.
39. Arora, S., K.O. Shreesh, and V. Divya, *Characterisation of Streptozotocin Induced Diabetes Mellitus in Swiss Albino Mice*. Global Journal of Pharmacology, 2009. **3**(2): p. 81-84.
40. Kim, N.N., et al., *Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with changes in vaginal hemodynamics, morphology and biochemical markers*. BMC Physiology, 2006. **6**.
41. Muller, Y.D., et al., *Immunosuppressive Effects of Streptozotocin-Induced Diabetes Result in Absolute Lymphopenia and a Relative Increase of T-Regulatory Cells*. Diabetes, 2011.
42. Rossini, A.A., et al., *Studies of Streptozotocin-Induced Insulinitis and Diabetes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977. **74**(6): p. 2485-2489.
43. Shafrir, E., A.A.F. Sima, and C. Ebooks. *Animal Models in Diabetes : A Primer*. 2000; Available from: [http://www.UCM.ebib.com/EBLWeb/patron?target=patron&extendedid=P\\_181592\\_0&](http://www.UCM.ebib.com/EBLWeb/patron?target=patron&extendedid=P_181592_0&).
44. Griffen, S.C., J. Wang, and M.S. German, *A genetic defect in beta-cell gene expression segregates independently from the fa locus in the ZDF rat*. Diabetes, 2001. **50**(1): p. 63-8.
45. Smith, A.C., et al., *Metformin and exercise reduce muscle FAT/CD36 and lipid accumulation and blunt the progression of high-fat diet-induced hyperglycemia*. American journal of physiology. Endocrinology and metabolism, 2007. **293**(1): p. 172-81.
46. Ren, J. and R.O. Kelley, *Cardiac Health in Women With Metabolic Syndrome: Clinical Aspects and Pathophysiology*. Obesity, 2009. **17**(6): p. 1114-1123.
47. Van Kempen, T.A., T.A. Milner, and E.M. Waters, *Accelerated Ovarian Failure: A novel, chemically induced animal model of menopause*. Brain Research. **In Press, Corrected Proof**.

48. Garland, T., Jr., et al., *The biological control of voluntary exercise, spontaneous physical activity and daily energy expenditure in relation to obesity: human and rodent perspectives*. The Journal of experimental biology, 2011. **214**(Pt): p. 206-29.
49. Foryst-Ludwig, A., et al., *Metabolic impact of estrogen signalling through ER $\alpha$  and ER $\beta$* . Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2010. **122**(1-3): p. 74-81.
50. Mauvais-Jarvis, F., *Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2010. **In Press, Corrected Proof**.
51. Ribas, V., et al., *Impaired oxidative metabolism and inflammation are associated with insulin resistance in ER $\alpha$ -deficient mice*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2010. **298**(2): p. E304-319.
52. Alonso-Magdalena, P., et al., *Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER  $\alpha$* . PLoS One, 2008. **3**(4).
53. Barros, R.P.A., U.F. Machado, and J.-Å. Gustafsson, *Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus*. Trends in Molecular Medicine, 2006. **12**(9): p. 425-431.
54. Nadal, A., et al., *The pancreatic [ $\beta$ ]-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2009. **304**(1-2): p. 63-68.
55. Nadal, A., et al., *The role of oestrogens in the adaptation of islets to insulin resistance*. The Journal of Physiology, 2009. **587**(21): p. 5031-5037.
56. Hagey, A.R. and M.P. Warren, *Exercise and Menopause: Positive Health Effects*. Menopause Management, 2006. **15**(3): p. 19-25.
57. Sowers, M., et al., *Changes in Body Composition in Women over Six Years at Midlife: Ovarian and Chronological Aging*. The Journal of clinical endocrinology & metabolism., 2007. **92**(3): p. 895.
58. Brown, L.M., et al., *Metabolic impact of sex hormones on obesity*. Brain Research, 2010. **1350**: p. 77-85.
59. Shi, H. and D.J. Clegg, *Sex differences in the regulation of body weight*. Physiol. Behav. Physiology and Behavior, 2009. **97**(2): p. 199-204.
60. Teede, H.J., C. Lombard, and A.A. Deeks, *Obesity, metabolic complications and the menopause: an opportunity for prevention*. Climacteric : the journal of the International Menopause Society, 2010. **13**(3): p. 203-9.
61. Gabal, L.L., D. Goodman-Gruen, and E. Barrett-Connor, *The Effect of Postmenopausal Estrogen Therapy on the Risk of Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus*. American journal of public health : JPH /, 1997. **87**(3): p. 443.
62. Kanaya, A.M., et al., *Glycemic effects of postmenopausal hormone therapy: the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Annals of Internal Medicine, 2003. **138**(1): p. 1-9.
63. Manson, J.E., et al., *A prospective study of postmenopausal estrogen therapy and subsequent incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus*. Annals of Epidemiology, 1992. **2**(5): p. 665-73.

64. Margolis, K.L., et al., *Effect of oestrogen plus progestin on the incidence of diabetes in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Hormone Trial*. Diabetologia, 2004. **47**(7): p. 1175-87.
65. Rossi, R., G. Origliani, and M.G. Modena, *Transdermal 17-beta-estradiol and risk of developing type 2 diabetes in a population of healthy, nonobese postmenopausal women*. Diabetes Care, 2004. **27**(3): p. 645-9.
66. Hawley, J.A. and S.J. Lessard, *review: Exercise training-induced improvements in insulin action*. Acta Physiologica, 2008. **192**(1): p. 127-135.
67. Pirimoglu, Z.M., et al., *Glucose tolerance of premenopausal women after menopause due to surgical removal of ovaries*. Climacteric. **0**(0): p. 1-5.
68. Morishima, A., M.M. Grumbach, and E.R. Simpson, *Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1995. **80**(12): p. pp. 3689-3698.
69. Smith, E.P., et al., *Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man*. The New England journal of medicine, 1994. **331**(16): p. 1056-61.
70. Jones, K.L. *Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity*. 2000; Available from: <http://arrow.monash.edu.au/hdl/1959.1/246537>.
71. Heine, P.A., et al. *Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- $\alpha$  knockout mice*.
72. Ding, E.L., *Sex steroid hormones and type 2 diabetes risk*. 2007.
73. Kalyani, R.R., et al., *The Association of Endogenous Sex Hormones, Adiposity, and Insulin Resistance with Incident Diabetes in Postmenopausal Women*. The Journal of clinical endocrinology & metabolism., 2009. **94**(11): p. 4127.
74. Puah, J.A. and C.J. Bailey, *Effect of ovarian hormones on glucose metabolism in mouse soleus muscle*. Endocrinology, 1985. **117**(4): p. 1336-40.
75. Rincon, J., et al., *Mechanisms behind insulin resistance in rat skeletal muscle after oophorectomy and additional testosterone treatment*. Diabetes, 1996. **45**(5): p. 615-21.
76. D'Eon, T.M., et al., *Estradiol and the Estradiol Metabolite, 2-Hydroxyestradiol, Activate AMP-activated Protein Kinase in C2C12 Myotubes*. Obesity, 2008. **16**(6): p. 1284-1288.
77. D'Eon, T.M., et al., *Estrogen Regulation of Adiposity and Fuel Partitioning*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(43): p. 35983-35991.
78. Rogers, N.H., et al., *Estradiol stimulates Akt, AMP-activated protein kinase (AMPK) and TBC1D1/4, but not glucose uptake in rat soleus*. Biochemical and biophysical research communications., 2009. **382**(4): p. 646.
79. Herrmann, U., et al., *Enzymology of human myometrium: Variations related to the hormonal milieu*. Archives of Gynecology and Obstetrics, 1987. **240**(4): p. 233-240.
80. Maggiulli, M.J., et al., *Enzyme activities in human endometrium, myometrium and leiomyomas of the uterus*. Enzyme, 1977. **22**(1): p. 13-8.



81. Milwidsky, A. and A. Gutman, *Glycogen metabolism of normal human myometrium and leiomyoma--possible hormonal control*. Gynecologic and Obstetric Investigation, 1983. **15**(3): p. 147-52.
82. Singhal, R.L., J.A. Thomas, and M.R. Parulekar, *Failure of [beta]-adrenergic blocking agents to alter estrogenic induction of uterine enzymes*. Life Sciences, 1972. **11**(5, Part 1): p. 255-261.
83. Shinkarenko, L., A.M. Kaye, and H. Degani, *<sup>13</sup>C NMR kinetic studies of the rapid stimulation of glucose metabolism by estrogen in immature rat uterus*. NMR in Biomedicine, 1994. **7**(5): p. 209-217.
84. Ko, B.-H., et al., *<sup>17</sup>{beta}-Estradiol Augments <sup>18</sup>F-FDG Uptake and Glycolysis of T47D Breast Cancer Cells via Membrane-Initiated Rapid PI3K-Akt Activation*. Journal of Nuclear Medicine, 2010. **51**(11): p. 1740-1747.
85. Linden, H.M. and D.A. Mankoff, *Breast Cancer and Hormonal Stimulation: Is Glycolysis the First Sign of Response?* Journal of Nuclear Medicine, 2010. **51**(11): p. 1663-1664.
86. Swislocki, A., E.S. Burgie, and K.J. Rodnick, *Effects of ovariectomy on indices of insulin resistance, hypertension, and cardiac energy metabolism in middle-aged spontaneously hypertensive rats (SHR)*. Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme, 2002. **34**(9): p. 516-22.
87. Valadares, J.R., R.L. Singhal, and M.R. Parulekar, *<sup>17</sup> beta-estradiol: inducer of uterine hexokinase*. Science (New York, N.Y.), 1968. **159**(818): p. 990-1.
88. Baquer, N.A. and P. McLean, *The effect of oestrogen on the activity and binding of multiple forms of hexokinase in the rat uterus*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1969. **37**(1): p. 158-164.
89. de Asua, L.J., E. Rozengurt, and H. Carminatti, *Estradiol induction of pyruvate kinase in the rat uterus*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1968. **170**(2): p. 254-262.
90. Singhal, R.L. and J.R.E. Valadares, *The effect of estrogen administration on phosphofructokinase activity in the rat uterus*. Life Sciences, 1966. **5**(14): p. 1299-1307.
91. Kumagai, S., A. Holmång, and P. Björntorp, *The effects of oestrogen and progesterone on insulin sensitivity in female rats*. Acta Physiologica Scandinavica, 1993. **149**(1): p. 91-97.
92. Contreras, F., et al. *Receptores SUR y sulfonilureas en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2*. 2002.
93. Le May, C., et al., *Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice*. Proceedings - National academy of Science USA, 2006. **103**(24): p. 9232-9237.
94. Sutter-Dub, M.T., *Rapid non-genomic and genomic responses to progestogens, estrogens, and glucocorticoids in the endocrine pancreatic B cell, the adipocyte and other cell types*. Steroids -San Francisco then Stoneham then New york-, 2002. **67**(2): p. 77-93.
95. Alonso-Magdalena, P., et al., *Research - Endocrine system - The Estrogenic Effect of Bisphenol A Disrupts Pancreatic b-Cell Function In Vivo and Induces Insulin Resistance*. Environmental health perspectives : EHP., 2006. **114**(1): p. 106.

96. Adachi, T., et al., *Promoting insulin secretion in pancreatic islets by means of bisphenol A and nonylphenol via intracellular estrogen receptors*. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association., 2005. **43**(5): p. 713-719.
97. Nadal, A., et al., *Rapid insulinotropic effect of 17beta-estradiol via a plasma membrane receptor*. The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1998. **12**(13): p. 1341-8.
98. Ropero, A.B., et al., *Non-genomic actions of 17beta-oestradiol in mouse pancreatic beta-cells are mediated by a cGMP-dependent protein kinase*. The Journal of Physiology, 1999. **521**: p. 397-407.
99. James, D.E., E.W. Kraegen, and D.J. Chisholm, *Effect of exercise training on whole-body insulin sensitivity and responsiveness*. Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology, 1984. **56**(5): p. 1217-22.
100. Saengsirisuwan, V., et al., *Effects of exercise training and antioxidant R-ALA on glucose transport in insulin-sensitive rat skeletal muscle*. Journal of applied physiology., 2002. **92**(1): p. 50.
101. Lemoine, S., et al., *Effect of endurance training on oestrogen receptor alpha expression in different rat skeletal muscle type*. Acta Physiologica Scandinavica, 2002. **175**(3): p. 211-217.
102. Green, J.S., et al., *The effects of exercise training on abdominal visceral fat, body composition, and indicators of the metabolic syndrome in postmenopausal women with and without estrogen replacement therapy: the HERITAGE family study*. Metabolism: Clinical and Experimental, 2004. **53**(9): p. 1192-6.
103. Stefanick, M.L., et al., *Effects of diet and exercise in men and postmenopausal women with low levels of HDL cholesterol and high levels of LDL cholesterol*. The New England journal of medicine, 1998. **339**(1): p. 12-20.
104. Cuff, D.J., et al., *Effective exercise modality to reduce insulin resistance in women with type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2003. **26**(11): p. 2977-82.
105. Giannopoulou, I., et al., *Exercise Is Required for Visceral Fat Loss in Postmenopausal Women with Type 2 Diabetes*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2005. **90**(3): p. 1511-1518.
106. Tokmakidis, S.P., et al., *The effects of a combined strength and aerobic exercise program on glucose control and insulin action in women with type 2 diabetes*. European Journal of Applied Physiology, 2004. **92**(4): p. 437-442.
107. Bauman, R.A., *The effects of wheel running, a light/dark cycle, and the instrumental cost of food on the intake of food in a closed economy*. Physiology & Behavior, 1992. **52**(6): p. 1077-83.
108. Latour, M.G., M. Shinoda, and J.M. Lavoie, *Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats*. Journal of applied physiology., 2001. **90**(1): p. 235.
109. Hawley, J.A., *Exercise as a therapeutic intervention for the prevention and treatment of insulin resistance*. Diabetes metabolism and Research Review, 2004. **20**(5): p. 383-393.

110. Zierath, J.R., A. Krook, and H. Wallberg-Henriksson, *Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle*. *Diabetologia*, 2000. **43**(7): p. 821-35.
111. Wallberg-Henriksson, H. and J.O. Holloszy, *Contractile activity increases glucose uptake by muscle in severely diabetic rats*. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology*, 1984. **57**(4): p. 1045-9.
112. Musi, N. and L. Goodyear, *Insulin Resistance and Improvements in Signal Transduction*. *Endocrine*, 2006. **29**(1): p. 73-80.
113. Ho, R.C., O. Alcazar, and L.J. Goodyear, *Exercise Regulation of Insulin Action in Skeletal Muscle*. *The Endocrine System in Sports and Exercise*. 2008: Blackwell Publishing Ltd. 388-407.
114. Slentz, C.A., et al., *Effects of exercise training intensity on pancreatic beta-cell function*. *Diabetes Care*, 2009. **32**(10): p. 1807-11.
115. Banks, E.A., et al., *Muscle glucose transport, GLUT-4 content, and degree of exercise training in obese Zucker rats*. *The American journal of physiology*, 1992. **263**(5): p. 1010-5.
116. Brozinick, J.T., Jr., et al., *Effects of exercise training on muscle GLUT-4 protein content and translocation in obese Zucker rats*. *The American journal of physiology*, 1993. **265**(3): p. 419-27.
117. Etgen, G.J., Jr., et al., *Exercise training reverses insulin resistance in muscle by enhanced recruitment of GLUT-4 to the cell surface*. *The American journal of physiology*, 1997. **272**(5): p. 864-9.
118. Bloem, C.J. and A.M. Chang, *Short-Term Exercise Improves  $\beta$ -Cell Function and Insulin Resistance in Older People with Impaired Glucose Tolerance*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2008. **93**(2): p. 387-392.
119. Marques, C.M.M., et al., *Beneficial effects of exercise training (treadmill) on insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in high-fat fed C57Bl/6 mice*. *Braz. J. Med. Biol. Res. Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2010. **43**(5): p. 467-475.
120. Choi, S.B., J.S. Jang, and S. Park, *Estrogen and exercise may enhance beta-cell function and mass via insulin receptor substrate 2 induction in ovariectomized diabetic rats*. *Endocrinology*, 2005. **146**(11): p. 4786-94.
121. Kiraly, M.A. *Exercise training attenuates pancreatic beta-cell decompensation and hepatic inflammation in the male Zucker diabetic fatty rat*. 2008; Available from: <http://hdl.handle.net/1807/11219>.
122. Romanovsky, D., J.C. Walker, and M. Dobretsov, *Pressure pain precedes development of type 2 disease in Zucker rat model of diabetes*. *Neuroscience Letters*, 2008. **445**(3): p. 220-223.
123. CharlesRiver. *Research animal models - ZDF rats*. Available from: <http://www.criver.com/en-US/ProdServ/ByType/ResModOver/ResMod/Pages/ZDFRat.aspx>.
124. Bergeron, R., et al., *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)-gamma Agonism Prevents the Onset of Type 2 Diabetes in Zucker Diabetic Fatty Rats: A Comparison with PPAR-delta Agonism*. *Endocrinology*, 2006. **147**(9): p. 4252-4262.

125. Bailey, C.J. and H. Ahmed-Sorour, *Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis. Effects of insulin secretion.* Diabetologia, 1980. **19**(5): p. 475-81.
126. Wu, S.-I., P. Chou, and S.-T. Tsai, *The impact of years since menopause on the development of impaired glucose tolerance.* Journal of Clinical Epidemiology, 2001. **54**(2): p. 117-120.
127. Rhee, S.Y., et al., *Characteristics of insulin resistance and insulin secretory capacity in Korean subjects with IFG and IGT.* Diabetes Res. Clin. Pract. Diabetes Research and Clinical Practice, 2010. **89**(3): p. 250-255.
128. Miyazaki, Y., et al., *Predictors of improved glycaemic control with rosiglitazone therapy in type 2 diabetic patients: a practical approach for the primary care physician.* The British Journal of Diabetes & Vascular Disease, 2005. **5**(1): p. 28-35.
129. Cali, A.M.G., et al., *Rosiglitazone Improves Glucose Metabolism in Obese Adolescents With Impaired Glucose Tolerance: A Pilot Study.* Obesity, 2011. **19**(1): p. 94-99.
130. Seltzer, H.S., et al., *Insulin secretion in response to glycemic stimulus: relation of delayed initial release to carbohydrate intolerance in mild diabetes mellitus.* The Journal of clinical investigation, 1967. **46**(3): p. 323-35.
131. Xu, J.W., et al., *Effects of estradiol on liver estrogen receptor-alpha and its mRNA expression in hepatic fibrosis in rats.* World journal of gastroenterology : WJG, 2004. **10**(2): p. 250-4.
132. Gorres, B.K., et al., *In vivo stimulation of oestrogen receptor  $\alpha$  increases insulin-stimulated skeletal muscle glucose uptake.* The Journal of Physiology, 2011. **589**(8): p. 2041-2054.
133. Yoshioka, K., et al., *Renal cytochrome P450 as a determinant of impaired natriuresis by PPAR-gamma ligands in ovariectomized obese rats.* Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(5): p. 965-71.
134. Belke, T.W. and J.P. Wagner, *The reinforcing property and the rewarding aftereffect of wheel running in rats: a combination of two paradigms.* Behavioural Processes, 2005. **68**(2): p. 165-72.
135. Campagna, P.D., *A modified voluntary running wheel for laboratory animals.* Laboratory Animal Science, 1984. **34**(4): p. 397-8.

## DEMANDE D'AUTORISATION DE RÉDIGER PAR ARTICLES

### 1. Identification de l'étudiant

Junior Simpson Mentor

### 2. Nom de l'unité académique

Département de kinésiologie, Faculté de kinésiologie

### 3. Nom du programme

M.Sc. Sciences de l'activité physique

Option physiologie de l'exercice

### 4. Article proposé

Titre: Exercise training protects against withdrawal of estrogen protection on glucose homeostasis in ZDF rats

Auteurs: Junior Simpson Mentor, Isabelle Côté, Émilienne Tudor Ngo Sock, Jean-Marc Lavoie et Raynald Bergeron

État: Article en préparation, revue et éditeur à déterminer.

### 5. Signature et déclaration de l'étudiant concernant l'article

Rôles remplis dans le cadre de l'article :

- Organisation, gestion et traitement des données de l'hébergement des animaux lors de la phase expérimentale
- Organisation, gestion et exécution des sacrifices animaux
- Exécution des analyses biochimiques et moléculaires des tissus obtenus lors du sacrifice animal
- Traitement et analyse des données, rédaction et mise en forme de l'article

Junior S. Mentor

### 6. Avis et signature du directeur de recherche

(Le directeur de recherche commentera de façon appropriée les informations présentées par l'étudiant dans sa demande et donnera son avis sur le projet de rédaction du mémoire ou de thèse par articles.)

Raynald Bergeron

### 7. Décision ou recommandation et signature du directeur de programme

(Dans le cas d'une demande d'autorisation de rédiger un mémoire par articles, le directeur de programme recueille toute information additionnelle qu'il juge pertinente et prend la décision d'autoriser ou non l'étudiant à procéder de cette façon. S'il s'agit d'une demande d'autorisation de rédiger une thèse par articles, le directeur fait une recommandation appropriée à la faculté compétente.)

François Prince

**ACCORD DES COAUTEURS ET PERMISSION DE L'ÉDITEUR****A) Déclaration des coauteurs d'un article****1. Identification de l'étudiant et du programme**

Junior Simpson Mentor

M.Sc. Sciences de l'activité physique

**2. Description de l'article**

Auteurs: Junior Simpson Mentor, Isabelle Côté, Émilienne Tudor Ngo Sock, Jean-Marc Lavoie et Raynald Bergeron

Titre: Exercise training protects against withdrawal of estrogen protection on glucose homeostasis in ZDF rats

État: Article en préparation, revue et éditeur à déterminer.

**3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant**

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Junior Simpson Mentor inclue l'article identifié ci-dessus dans le mémoire de maîtrise qui a pour titre *Effets de l'ovariectomie et de l'activité physique sur l'homéostasie du glucose chez les rates ZDF*.

Isabelle Côté  
Coauteur

Émilienne T. Ngo Sock  
Coauteur

Jean-Marc Lavoie  
Coauteur

Raynald Bergeron  
Coauteur

