

## UNIVERSITE DE STRASBOURG

**École Doctorale des Sciences de la vie et de la Santé**

**UMR 7178 – Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien,**

**Département d'Écologie, Physiologie, Éthologie**

Discipline : **Sciences du Vivant**

Spécialité : **Physiologie humaine**

Présentée par : **Anthony DAMIOT**

Soutenue le : **12 Décembre 2018**

# **Effet d'une contremesure nutritionnelle sur l'inflexibilité métabolique induite par simulation d'impesanteur chez l'homme**

**Thèse codirigée par :**

**Stéphane BLANC** Directeur de recherche CNRS, IPHC, Université de Strasbourg  
**Chantal SIMON** Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université de Lyon

**Rapporteurs :**

**Martine LAVILLE** Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université de Lyon  
**Takeshi NIKAWA** Professeur des Universités, Tokushima, Japon

**Autres membres du jury :**

**Serge POTIER** Professeur des Universités, Université de Strasbourg

**Membre invité :**

**Guillemette GAUQUELIN-KOCH** Docteur, Responsable des Sciences de la Vie au CNES



## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les personnes qui ont partagé de près ou de loin ces trois ans de thèse avec moi.

*Madame le Professeur Martine Laville*, je tiens à vous exprimer ma gratitude d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de vous être déplacée pour faire partie de ce jury de thèse.

*Monsieur le Professeur Takeshi Nikawa*, je vous adresse mes remerciements pour avoir accepté de juger ce travail de thèse et pour le voyage que vous avez effectué du Japon pour assister à ma soutenance de thèse.

*Monsieur le Professeur Serge Potier*, je tiens à vous remercier d'avoir accepté d'évaluer ce travail et faire partie de ce jury de thèse.

*Madame le Docteur Guillemette Gauquelin-Koch*, sans le soutien financier du CNES, ce projet de thèse n'aurait pu se réaliser. Je tiens donc à vous adresser mes remerciements pour le crédit octroyé au cours de ces trois dernières années pour mener à bien ce travail de recherche. Je tiens également à vous remercier pour la sincérité dont vous avez fait preuve à mon égard. Je vous remercie pour le soutien que vous m'avez accordé lors de mes différentes présentations. J'ai également été enchanté des moments partagés en votre compagnie à Toulouse et à Pasadena.

*Madame le Professeur Chantal Simon*, de nombreux remerciements vous sont destinés. Tout d'abord, je vous remercie de la confiance que vous m'avez accordée trois ans plus tôt pour m'offrir la possibilité de réaliser ma thèse. Je vous remercie également pour la franchise, la patience et l'excellence dont vous avez fait preuve au cours de ces trois années pour m'aider à mener à bien ce travail de recherche. Je ne serai jamais assez reconnaissant pour l'immense aide dont vous m'avez fait bénéficier pour l'analyse statistique des résultats qui fondent ce manuscrit de thèse. Je souhaite également vous remercier pour les conseils prodigués au cours des phases d'écriture des articles et de la thèse.

*Monsieur le Docteur Stéphane Blanc*, tout comme Chantal, tous les remerciements de circonstance ne suffiront pas pour exprimer ma gratitude. Un immense merci pour la confiance que tu m'as accordée il y a de cela trois ans. Merci pour tous les espoirs que tu as fondés en moi tout au long de la thèse. Merci de m'avoir permis de m'épanouir au cours des différentes études cliniques à Toulouse. Je souhaite également te remercier pour ton abnégation, ta bienveillance et ta patience face à mes doutes. Je te remercie également pour tes encouragements et ton soutien au cours de ces trois ans. Je tiens également à te remercier pour les différentes missions auxquelles j'ai eu l'immense bonheur de m'investir à Toulouse et à Uberlingen. Merci également de m'avoir permis de voyager à Ottawa et Pasadena. Merci de m'avoir initié à la recherche spatiale, aux protocoles cliniques et merci pour toutes les rencontres occasionnées au cours de ces trois ans. Pour tout cela je t'en suis éternellement reconnaissant.

*Madame le Docteur Audrey Bergouignan*, je souhaite particulièrement te remercier pour ta disponibilité de tous les instants. Un grand merci pour tes conseils avisés au moment de la rédaction des articles et de la thèse. Malgré la distance, j'ai appris à apprécier le décalage horaire entre la France et les États-Unis. Merci aussi pour tous les moments partagés au cours de l'étude d'alitement entre membres de « l'équipe du soir ». Merci pour ton soutien moral tout au long de la thèse et en particulier au cours de ces derniers mois. Enfin merci pour ta joie de vivre, tes fous rires et autres moments de détente accordés à la fin de l'étude d'alitement entre autres.

*Madame le Docteur Sylvie Normand*, merci pour toute l'aide apportée aux cours des différents protocoles réalisés à Toulouse. Merci pour ton organisation, ton soutien et ta joie de vivre communicative. Merci aussi d'avoir accepté de m'héberger avant le départ à Pasadena. C'est avec grand plaisir que j'ai partagé ces moments en ta compagnie.

*Monsieur le Docteur Donal O'Gorman*, je tiens à vous remercier pour l'analyse des échantillons de l'étude pilote de 2015. Merci pour les conseils apportés au cours de la rédaction des articles de cette thèse. Enfin, un immense merci pour votre professionnalisme, votre rigueur et votre aide précieuse lors de l'étude d'alitement.

Je souhaite également remercier *Madame le Docteur Theresa Backlund* et *Monsieur le Professeur Guy Trudel* pour leur accueil au sein de la faculté de Médecine d'Ottawa pour l'analyse des résultats d'imagerie. Merci du fond du cœur pour votre disponibilité, votre aide et votre gentillesse. Vous avez rendu mon séjour à Ottawa on ne peut plus agréable.

Je souhaite également adresser mes remerciements à toutes les équipes qui ont participé à cette thèse, notamment *Angèle Chopard* et *Guillaume Py* pour les analyses d'une partie des biopsies musculaires. Merci également à *Jocelyne Draï*, *Delphine Collin-Chavagnac*, *Charlotte Cuerq* et *Étienne Lefai* pour leurs analyses. Enfin, je souhaite remercier *Michel Prost*, grâce à qui ces études ont également eu lieu. Merci de nous avoir fourni le cocktail nutritionnel utilisé comme contremesure au cours des protocoles de cette thèse.

Je souhaite tout particulièrement remercier *Isabelle*, chimiste de l'équipe du bas et marcheuse invétérée, véritable maman dont la sincérité n'a d'égal que son humour décapant et tranchant. De la même manière je souhaite adresser ma reconnaissance à *Alexandre*, mon partenaire de HIIT et de paris sportifs généralement infructueux, friand de technologies et autres gourmandises. Je vous remercie d'avoir tout mis en œuvre pour la réussite de ce travail de recherche. Merci pour tout le savoir partagé au cours de ces trois dernières années. Les journées au laboratoire auraient été bien mornes sans votre présence au quotidien. Merci pour les gourmandises distribuées avec parcimonie au cours de ces trois années. Merci pour votre tendresse, votre bonne humeur, votre disponibilité de tous les instants. Je vous dois tout !

Merci également à *Claire*, qui a récemment intégré l'équipe Blanc. Merci pour ton soutien, ta gentillesse et ton aide au cours de l'étude d'alitement.

Je tiens particulièrement à remercier *l'ensemble des membres du MEDES* qui ont accueilli et organisé l'étude pilote et les deux sessions de l'étude d'alitement. Merci à *Marie-Pierre Bareille, Marie-Claude Costes-Salon, Arnaud Beck, Pascale Vasseur, Corinne Lombard, Véronique Rayjal* et *Béatrice Rigaud*. C'était un immense privilège et plaisir d'évoluer à vos côtés au cours des différentes études qui fondent ce travail de recherche. Merci pour votre aide de tous les instants, votre joie de vivre et votre gentillesse. L'équipe du MEDES ne serait pas complète sans les *infirmiers et infirmières* : *Delphine, Laurie, Suzanne, Anne, Chantal, Emma, Sophie, Fatima* et *David*. Merci pour votre aide primordiale, votre efficacité, votre douceur, votre bonne humeur et votre humour qui ont contribué au bon déroulement des différents protocoles réalisés.

Merci également à *l'équipe des aides soignant(e)s* pour la multitude de tâches accomplies au quotidien pour les équipes de recherche comme pour les volontaires. Merci également pour leur gentillesse exceptionnelle, leur bonne humeur, leur humour et l'ensemble des services rendus qui ont rendu les jours passés au sein du MEDES encore plus agréables.

Je tiens également à remercier les *volontaires de l'étude pilote* : *Abdelkader, Sébastien, Chris, Laurent, Paul, Vincent, Adrien, Sylvain, Arnaud, Philippe, Ghyslain, Jean-Pierre, Romain, Bruno, François, Victor, Sébastien, Marc-Antoine, Laurent et Frédéric*. Merci pour votre participation et votre dévouement. Merci pour votre compréhension, votre complaisance votre bonne humeur et votre humour lors des jours de visite au MEDES. Ce fut un réel plaisir de vous rencontrer et de partager ces moments avec vous.

Mes remerciements sont également apportés aux *volontaires de l'étude d'alitement* : *François, David, Mathieu, Bernard, Olivier, Henry, Aïnou, Cédric, Hugo, Laurent, Grégoire, Mathieu, Thomas, Yann, Gaël, Philippe, Anthony, Sébastien, Damien et Nicolas*. Presque deux mois passés en votre compagnie a été un réel plaisir. Je ne saurai jamais assez vous remercier pour le dévouement dont vous avez fait preuve pour cette étude d'alitement. Merci de votre gentillesse, de votre compréhension, de votre curiosité aux cours des différents jours de tests. Merci pour tous les moments partagés en dehors des protocoles et les nombreux fous rires partagés. Merci également pour le soutien que vous avez pu me témoigner. Je vous suis hautement reconnaissant pour votre contribution à ce travail de recherche.

Je souhaite remercier vivement *Madame le Docteur Isabelle de Glisezinski* pour avoir pris de son temps pour nous venir en aide au cours de l'étude d'alitement prolongé. Un grand merci pour l'immense générosité et la gentillesse dont tu as bien voulu me témoigner pour me loger aux cours des différentes périodes de tests à Toulouse. Je te remercie de la confiance que tu m'as accordée. Enfin, je tiens vraiment à te remercier pour les festins et autres gourmandises concoctées au cours de nos séjours à Toulouse.

Enfin et non des moindres, je tiens à faire part de mon plus profond respect, ma plus grande gratitude envers *Monsieur le Docteur François Crampes* avec qui j'ai eu l'immense privilège de travailler au cours de ces trois années de thèse. Merci infiniment pour le travail exceptionnel que tu as fourni sur la calorimétrie indirecte. Merci pour ton investissement infallible, pour tes conseils avisés, merci d'avoir partagé ton savoir et de m'avoir pris sous ton aile au cours de ces trois ans. Je te remercie également pour ta générosité et ta gentillesse sans égales. Merci aussi de m'avoir invité à partager tant de repas auprès de toi et Isabelle. Je n'oublierai jamais les délicieuses fouaces du Mardi. Un grand merci pour la confiance et le soutien que tu m'as accordé. Merci beaucoup pour tous les moments que j'ai eu la chance de partager avec toi au MEDES et en dehors. Merci pour ta sincérité, pour ton humour et ta joie de vivre communicatrice. Merci pour tout !

*À l'ensemble des membres de l'IPHC et du DEPE*

Merci à la direction de l'IPHC représentée par *Christelle Roy* puis *Rémi Barillon* qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions. Je joins également mes remerciements aux directeurs du DEPE, *François Criscuolo* et *Caroline Habold*, qui se sont succédés au cours de mes trois ans de thèse.

Un grand merci à *Claudine* et *Martine* pour la gestion des commandes, des missions et toutes autres responsabilités administratives. Plus encore, je tiens à vous remercier pour votre tendresse, votre gentillesse et votre bonne humeur au quotidien, qui ont également participé à rendre ses trois années agréables. Je souhaite également adresser mes remerciements à *Brigitte*. Merci pour ta gentillesse, ta tendresse, ta disponibilité et ton soutien au cours de ces trois années. J'ai été plus qu'enchanté de partager le temps de midi avec toi au quotidien.

Enfin merci à l'ensemble des *chercheurs, ingénieurs, techniciens, animaliers, doctorants, étudiants, stagiaires* pour la gentillesse dont vous avez toujours fait preuve à mon égard.

Je tiens enfin à remercier *mes amis et ma famille* pour votre soutien indéfectible.

Tout d'abord, cette thèse a été pour moi l'occasion de nouer une nouvelle amitié, *John*, merci pour tous les moments partagés au cours de l'étude d'alitement à Toulouse. À nos discussions, nos fous rires et nos sorties.

Merci à mes chers amis, *Sébastien, Stéphane, J-b, Brice, Antoine* pour avoir été là depuis toujours depuis de nombreuses années. Je tiens également à adresser mes remerciements à mon compagnon de galère depuis que je suis à Strasbourg et pour qui les années n'ont fait que renforcer notre amitié, merci pour tout *Alexandre*.

Merci aux nouvelles rencontres qui m'ont été donné de faire. Merci à *Nicolas & Éric, Camille & Mats* ainsi que *Marie & Nicolas* pour leur amitié et leur soutien au quotidien.

Ma gratitude et tout mon amour sont également adressés à *Justine* avec qui je partage désormais mes joies et mes peines au quotidien. Merci de croire en moi.

Enfin, les mots seront toujours trop faibles pour remercier *ma famille* et particulièrement *mes parents* pour leurs encouragements, leur confiance et les espoirs fondés en moi.

## Table des matières

|  |           |
|--|-----------|
| <b>LISTE DES COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS</b> .....  | <b>9</b>  |
| <b>COMMUNICATIONS :</b> .....  | <b>9</b>  |
| PRESENTATIONS ORALES :.....  | 9         |
| COMMUNICATIONS AFFICHÉES: .....  | 9         |
| <b>PUBLICATIONS :</b> .....  | <b>10</b> |
| <b>PUBLICATIONS EN PREPARATION :</b> .....   | <b>10</b> |
| <b>1. LA CONQUETE SPATIALE</b> .....   | <b>14</b> |
| A. LES PREMIERS PROGRAMMES SPATIAUX.....   | 14        |
| B. LES STATIONS SPATIALES .....  | 15        |
| C. L'EMERGENCE DE NOUVEAUX PAYS SPATIAUX .....   | 16        |
| D. LES SOCIETES PRIVEES.....   | 16        |
| E. FUTURES EXPLORATIONS ET ENJEUX .....  | 17        |
| <b>2. LES ADAPTATIONS AUX VOLS SPATIAUX ET A LA MICROGRAVITE</b> .....                                     | <b>20</b> |
| A. MICROGRAVITE REELLE ET SIMULEE, LES MODELES D'ETUDES.....   | 20        |
| B. CONSEQUENCES DES VOLS SPATIAUX.....   | 27        |
| i. Exposition aux radiations .....   | 27        |
| ii. Adaptations psychologiques.....  | 28        |
| iv. Impact sur le système immunitaire .....  | 29        |
| C. ADAPTATIONS CAUSEES PAR LA MICROGRAVITE .....   | 30        |
| i. Le système cardiovasculaire.....  | 30        |
| ii. Le système squelettique .....  | 34        |
| iii. Le système musculaire .....   | 35        |
| <b>3. BALANCE ENERGETIQUE ET ATTEINTES METABOLIQUES SECONDAIRES A L'EXPOSITION A LA MICROGRAVITE</b> ..... | <b>38</b> |
| A. REGULATION DE LA BALANCE ENERGETIQUE.....   | 38        |
| B. DONNEES ISSUES DES VOLS SPATIAUX ET DES ETUDES DE MICROGRAVITE SIMULEE .....                            | 40        |
| C. CORRELAT ENTRE MICROGRAVITE ET SEDENTARITE .....  | 42        |
| D. LES DIFFERENTES ATTEINTES METABOLIQUES .....  | 43        |
| i. Résistance à l'insuline .....   | 43        |
| ii. Développement d'une hypertriglycéridémie.....  | 45        |
| iii. Réduction de l'oxydation des lipides et stockage ectopique musculaire .....                           | 46        |
| iv. Stockage ectopique de lipides et impact hépatique .....  | 48        |
| E. DEFINITION DE L'INFLEXIBILITE / FLEXIBILITE METABOLIQUE.....  | 51        |
| <b>4. HISTORIQUES ET EVOLUTION DES CONTREMESURES</b> .....   | <b>55</b> |
| A. CONTREMESURE D'EXERCICE.....  | 57        |
| B. CONTREMESURE PHARMACOLOGIQUE.....   | 61        |
| C. CONTREMESURE NUTRITIONNELLE.....  | 64        |
| D. LES NUTRIMENTS ANTIOXYDANTS, ANTI-INFLAMMATOIRES ET AVANTAGE D'UNE APPROCHE PAR COCKTAIL.....           | 65        |
| i. Données issues des études spatiales .....   | 65        |
| ii. DONNEES ISSUES DE LA POPULATION GENERALE .....   | 70        |
| <b>OBJECTIFS &amp; HYPOTHESES</b> .....  | <b>75</b> |
| A. <b>OBJECTIFS GENERAUX</b> .....   | <b>76</b> |
| B. <b>HYPOTHESES</b> .....   | <b>76</b> |

**PILOT STUDY: A NUTRIENT COCKTAIL PREVENTS LIPID METABOLISM ALTERATIONS INDUCED BY 20 DAYS OF DAILY STEPS REDUCTION AND FRUCTOSE OVERFEEDING: RESULT FROM A RANDOMIZED STUDY ..... 78**

A. RESUME..... 78

**EFFECT OF AN ANTI-OXIDANT DIETARY COCKTAIL ON METABOLIC FLEXIBILITY INDUCED BY 60 DAYS OF BED REST IN HEALTHY MALE ADULTS..... 108**

A. RESUME ..... 108

**DISCUSSION..... 147**

**PERSPECTIVES ..... 153**

**REFERENCES ..... 156**

**ANNEXE 1: METABOLIC INFLEXIBILITY IS AN EARLY MARKER OF BED-REST INDUCED GLUCOSE INTOLERANCE EVEN WHEN FAT MASS IS STABLE..... 173**



# Liste des communications et publications

## Communications :

### Présentations orales :

- Effects of a nutritional cocktail consisting of anti-oxidant and anti-inflammatory supplements to prevent ectopic fat storage and carbohydrate and lipid metabolism adaptations induced by 60 days of Antiorthostatic bed rest. **Damiot A.**, Noone J., Chery I., Zahariev A., Crampes F., De Glisezinski I., Bareille M.P., Cuerq C., Collin-Chavagnac D., Laurens C., Sheikh A., Backlund T., Gauquelin-Koch G., Prost M., Trudel G., Blanc S., O’Gorman D., Simon C., Bergouignan A. *Committee on Space Research 2018, Pasadena, United-States of America (July 18 2018)*
- A nutrient cocktail prevents the deterioration in lipid metabolism induced by 20 days of daily step reduction and fructose overfeeding. **Damiot A.**, Demangel R., Noone J., Chery I., Zahariev A., Normand S., Brioche T., Crampes F., De Glisezinski I., Lefai E., Chopard A., Draï J., Collin Chavagnac D., Heer M., Gauquelin-Koch G., Prost M., Simon P., Py G., Bergouignan A., Simon C., Blanc S., O’Gorman D. *Second Japan / French symposium on Space Nutrition, Toulouse, France (October 26 2017).*
- A nutrient cocktail prevents the deterioration in lipid metabolism induced by 20 days of daily step reduction and fructose overfeeding **Damiot A.**, Demangel R., Noone J., Chery I., Zahariev A., Normand S., Brioche T., Crampes F., De Glisezinski I., Lefai E., Chopard A., Draï J., Collin Chavagnac D., Heer M., Gauquelin-Koch G., Prost M., Simon P., Py G., Bergouignan A., Simon C., Blanc S., O’Gorman D. *Journées jeunes Chercheurs CNES, Toulouse, France (October 3 2017).*
- Anti-oxidant cocktail supplementation as a countermeasure against musculo-skeletal system and metabolic alterations induced by physical inactivity. **Damiot A.**, Demangel R., Brioche T., Pagano A., Crampes F., Lefai E., O’Gorman D., Chopard A., Chery I., Zahariev A., Normand S., Draï J., Collin-Chavagnac D., Heer M., Gauquelin-Koch G., Prost M., Simon P., Py G., Bergouignan A., Simon C., Blanc S. *ESA / CNES / ISGP Joint Life Science Meeting, Toulouse, France (June 5 2016).*

### Communications affichées:

- A nutrient cocktail prevents the deterioration in lipid metabolism induced by 20 days of daily step reduction and fructose overfeeding. **Damiot A.**, Demangel R., Noone J., Chery I., Zahariev A., Normand S., Brioche T., Crampes F., De Glisezinski I., Lefai E., Chopard A., Draï J., Collin Chavagnac D., Heer M., Gauquelin-Koch G., Prost M., Simon P., Py G., Bergouignan A., Simon C., Blanc S., O’Gorman D. *Journées Jeunes Chercheurs CNES, Toulouse, France (October 3 2017).*

## Publications :

- A nutrient cocktail prevents lipid metabolism disorders induced by 20 days of step reduction and fructose overfeeding. **Damiot A.**, Demangel R., Noone J., Chery I., Zahariev A., Normand S., Brioché T., Crampes F., De Glisezinski I., Lefai E., Bareille M-P., Chopard A., Draï J., Collin Chavagnac D., Heer M., Gauquelin-Koch G., Prost M., Simon P., Py G., Bergouignan A., Simon C., Blanc S., O’Gorman D. *Journal of applied Physiology*, 2018.
- Metabolic inflexibility is an early marker of bed-rest induced muscle insulin resistance even when fat mass is stable. Rudwill F., O’Gorman D., E Lefai E., Chery I., Zahariev A., Normand S., Pagano A., Chopard A., **Damiot A.**, Laurens C., Hodson L., Canet-Soulas E., Heer M., Frings Meuthen P., Buehlmeier J., Baecker N., Meiller L., Gauquelin-Koch G., Blanc S., Simon C., Bergouignan A. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2018 Mar 12.

## Publications en préparation :

- Effect of an anti-oxidant dietary cocktail on metabolic flexibility induced by 60 days of bed rest in men. **Damiot A.**, O’Gorman D, Noone J., Chery I., Zahariev A., Normand S., Laurens C., Crampes F., De Glisezinski I., Cuerq C., Collin-Chavagnac D., Gauquelin-Koch G., Prost M., Simon C., Blanc S., Bergouignan A.

## Préambule

L'exploration est constitutive de la nature humaine. Depuis le monde méditerranéen, le moyen-âge, la route maritime vers l'extrême Orient, avec Christophe Colomb et Magellan comme exemples, l'Homme n'a eu de cesse de conquérir ou d'atteindre des territoires encore vierges.

Alors que la conquête spatiale fût l'apogée de la fin du XX<sup>ème</sup> siècle, l'exploration spatiale entreprise depuis le début du XXI<sup>ème</sup> siècle entrevoit l'espoir de nouvelles découvertes pour l'Homme et en fait un domaine de recherche des plus stimulants. Les projets spatiaux, tels que la station lunaire, le voyage vers Mars ou encore le tourisme spatial en sont de parfaits exemples en termes d'avancées technologiques et scientifiques.

De Youri Gagarine en 1961 à aujourd'hui, les agences spatiales internationales coopèrent pour assurer une présence constante de l'Homme dans l'espace. L'ensemble des missions spatiales a permis de démontrer que l'Homme pouvait survivre dans l'espace avec toutefois un impact sur l'ensemble des systèmes physiologiques. Les principales adaptations sont bien décrites et restent en deçà des seuils d'alertes médicales pour les durées des missions passées et actuelles. En revanche, elles posent des défis pour les vols de longues durées tels que ceux envisagés vers Mars ou la Lune. Ces perturbations incluent les adaptations cognitives, les mutations génétiques dues aux rayons ionisants, l'augmentation du risque d'infection, les perturbations cardiovasculaires et métaboliques mais aussi la perte osseuse et l'atrophie musculaire dont la réversibilité pour des missions planétaires reste encore inconnue. Ces défis sont importants, ils peuvent affecter les performances des astronautes lors de l'exploration planétaire, voir compromettre le succès des missions et interférer avec un retour en bonne santé des astronautes sur la planète Terre. Pour ces raisons, l'étude des mécanismes d'adaptation à l'espace, tout comme la définition de contremesures efficaces permettant de prévenir et/ou réduire ces adaptations sont des priorités de recherche pour les agences spatiales.

Du fait du nombre limité d'astronautes en vol et du coût des missions spatiales, ces études sont en partie réalisées via des modèles de simulation sur Terre ; en particulier le modèle d'alitement prolongé tête déclive chez l'Homme. Notre équipe utilise ce modèle depuis une quinzaine d'année pour caractériser les mécanismes sous-tendant les adaptations métaboliques et énergétiques à l'environnement spatial.

Grâce aux études que nous avons conduites, une cascade d'événements conduisant à cet état physiopathologique a été proposée. Selon cette cascade, l'hypodynamie induite par l'impesanteur réelle ou simulée entraîne une réduction du turnover énergétique musculaire et l'accumulation de lipides bioactifs comme les céramides et di-acyl-glycérols ayant un impact négatif sur la sensibilité à l'insuline. L'hypokinésie entraîne de son côté un remodelage musculaire qui se traduit par une atrophie, un shift dans le typage de fibres musculaires au profit des fibres rapides caractérisées par une capacité oxydative mitochondriale réduite. Ceci se traduit par une capacité réduite pour la captation et l'oxydation des acides gras circulants. En situation postprandiale un relargage accru des acides gras suite à l'hydrolyse des lipoprotéines favoriserait le stockage de lipides dans des organes non dédiés à cet effet, en particulier au niveau du foie, du muscle et de la moelle osseuse. Au niveau du foie, l'hyperinsulinémie favoriserait la lipogenèse de novo contribuant à l'hypertriglycéridémie et au stockage ectopique des lipides. L'ensemble de cette cascade conduirait, à une fatigabilité musculaire accrue en

réponse à l'exercice et un état proche de ce que l'on observe dans le syndrome métabolique. Cette succession d'évènements mène à un état dit d'inflexibilité métabolique, concept intégratif qui permet de comprendre les mécanismes qui relient les comportements sédentaires aux perturbations métaboliques. Particulièrement, l'inflexibilité métabolique se définit par une incapacité de l'organisme à adapter l'oxydation des substrats énergétiques en fonction de leur disponibilité.

**Le premier objectif** de cette thèse est de caractériser l'état d'inflexibilité métabolique induit par un alitement de 60 jours chez l'homme sain.

**Le second objectif** est de faire progresser nos connaissances dans la mise au point de contremesures. Différentes contremesures ont d'ores et déjà été testées ces 60 dernières années, telles que des supplémentations pharmacologiques, l'exercice physique et plus récemment diverses supplémentations nutritionnelles. Ces dernières présentent l'avantage de cibler l'ensemble des systèmes physiologiques impactés par la microgravité, d'être facile à implémenter dans l'espace et de ne pas être chronophage. Plus récemment, des études suggèrent que des micronutriments, minéraux et acides gras essentiels ayant tous des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires, peuvent constituer un nouveau type de contremesure efficace sur de nombreuses fonctions biologiques affectées par la microgravité. Plus encore, il semble que la combinaison de certains micronutriments utilisés en « cocktail » à petites doses se traduirait par une synergie entre les composés entraînant des effets positifs plus conséquents que si chaque micronutriment était pris individuellement, même à forte dose. Ainsi, le second objectif de cette thèse est de mettre en évidence l'impact positif d'une contremesure nutritionnelle à base d'antioxydants et d'anti-inflammatoires sur le déconditionnement métabolique étudié dans l'objectif 1. Compte tenu des très larges coûts associés aux études d'alitement prolongé, l'objectif 2 a fait l'objet d'une étude de faisabilité chez l'Homme en condition de vie libre.

Pour répondre à ces deux objectifs, cette thèse est décomposée comme suit :

L'**INTRODUCTION** se décline en cinq chapitres. Après un rappel des grandes phases de la conquête de l'espace et des défis futurs énoncés dans le **Chapitre 1**, les contraintes liées aux vols spatiaux, à la microgravité et les modèles d'études du déconditionnement spatial seront présentés dans le **Chapitre 2**. Sur la base de la bibliographie récente, le **Chapitre 3** est consacré aux connaissances actuelles sur l'adaptation métabolique et le stockage ectopique de lipides causé par le déconditionnement spatial, en regard des données connues sur Terre en situation physiopathologique. Le **Chapitre 4** présente quant à lui l'historique et l'évolution des contremesures mises en œuvre par les agences spatiales. Un intérêt particulier est porté aux données fondamentales et cliniques actuellement à notre disposition sur les micronutriments ainsi que sur leur utilisation synergique en « cocktail ». Enfin, j'expose les objectifs et hypothèses de ce travail de thèse dans le **Chapitre 5**.

La **PARTIE EXPERIMENTALE** se décompose en deux chapitres. Le **Chapitre 1** est consacré à l'étude pilote menée en 2015, qui nous a permis de valider l'utilisation du cocktail d'antioxydant et d'anti-inflammatoires comme contremesure lors de l'étude d'alitement prolongé de 2017 de 60 jours. Dans le **Chapitre 2**, je présente les résultats obtenus à ce jour lors de cette étude d'alitement prolongé. Enfin une dernière partie est consacrée à la **DISCUSSION** et aux **PERSPECTIVES** de ce travail de thèse.

# Introduction

## 1. La conquête spatiale

### a. Les premiers programmes spatiaux

La curiosité et le désir de voyager dans l'espace a toujours inspiré l'Homme mais vaincre la force gravitationnelle pour se placer en orbite autour de la Terre implique des connaissances scientifiques et des technologies qui n'ont été acquises qu'au cours du XX<sup>ème</sup> siècle. Suite à la seconde guerre mondiale, seulement deux pays ressortent gagnants, à savoir les États-Unis et l'Union des Républiques Socialistes Soviétiques (URSS). Dans le contexte de guerre froide qui régnait dans la deuxième moitié du XX<sup>ème</sup> siècle et en profitant des avancées technologiques allemandes, notamment dans le domaine des missiles, ces deux superpuissances se livrent alors une course à l'espace pour le prestige national. Dans cette course, les soviétiques furent les premiers à mettre en orbite un satellite, Spoutnik-1 le 4 Octobre 1957. Un mois plus tard, les soviétiques réalisent le premier vol habité dans l'espace en envoyant la chienne Laïka à bord de Spoutnik-2, le 3 Novembre 1957. Désireux de rattraper l'URSS dans la conquête de l'espace, les Américains, plus particulièrement les forces armées des États-Unis, placent un satellite sur orbite terrestre, Explorer-1 le 1<sup>er</sup> Février 1958. La NASA, agence spatiale des États-Unis est fondée plus tard, le 1<sup>er</sup> Octobre 1958. En 1961, les Russes en la personne de Yuri Gagarine, réalisent le 1<sup>er</sup> vol orbital habité par un humain. Cette prouesse a alors donné un net avantage à l'Union Soviétique dans la conquête de l'espace. L'étape suivante de la conquête spatiale a été marquée par les différentes missions Apollo à la fin des années 1960 et le début des années 1970 [1]. Particulièrement, la mission Apollo-11 a permis aux deux astronautes de la NASA, Neil Armstrong et Buzz Aldrin d'effectuer les premiers pas de l'Homme sur la Lune, le 20 Juillet 1969. Le programme Apollo est achevé en 1972 avec une dernière mission lunaire. Bien que ces missions aient été relativement courtes (de l'ordre de quelques heures à 14 jours), avec une collecte de données scientifiques limitée, des études se sont intéressées tout de suite à l'impact de la microgravité sur la santé des astronautes. Les résultats des études des premiers vols spatiaux ont démontré que les astronautes présentaient une intolérance orthostatique réversible, une réduction du volume plasmatique, une perte de poids et une perte de volume au niveau des jambes [2].

En parallèle, la conquête spatiale s'internationalise avec des pays comme le Canada, l'Italie, la France, l'Australie ou le Japon qui lancent leur premier satellite entre 1962 et 1970 à des fins géostratégiques pour permettre et surveiller les communications dans le contexte tendu de Guerre Froide qui régnait à cette époque. L'émergence de nouveaux pays et les coûts élevés des missions spatiales ont amené les différents pays à penser différemment la conquête spatiale, par le développement de stations spatiales destinées à assurer plusieurs missions spatiales et ainsi développer de nouveaux matériaux et équipements pour l'avenir. Les avancées technologiques avaient pour but d'améliorer les réseaux de surveillance et de télécommunication, principalement militaires, tandis que les données des explorations spatiales humaines devaient permettre d'étudier les conséquences biologiques de la microgravité sur les organismes sur des périodes plus longues et dans de meilleures conditions.

## b. Les stations spatiales

Depuis le début des années 1960 jusqu'à la fin des années 1970, Américains et Russes travaillaient également sur la mise en orbite de stations spatiales, essentiellement pour des missions d'espionnage. La station orbitale Saliout 5 fut la dernière station utilisée à des fins militaires. Les Russes ont été encore une fois les premiers à mettre en orbite la première station spatiale orbitale habitée en permanence, à partir du 19 Avril 1971. Plus tard, le 14 Mai 1973, la NASA satellise la station orbitale américaine Skylab dans le but d'observer le Soleil et d'étudier l'adaptation de l'Homme en situation de microgravité. Ces stations spatiales de première génération, dits « monolithiques » n'étaient pas conçues pour ajouter des modules spatiaux. Ils étaient mis en orbite avec l'ensemble de l'équipement nécessaire pour la mission et l'équipage rejoignait la station plus tard. Les stations Saliout 6 et Saliout 7 se virent doter de deux terminaux d'amarrage supplémentaires pour permettre la visite d'un second équipage, amenant avec lui un nouveau véhicule spatial. Cette extension des stations spatiales servit de transition vers l'utilisation de stations modulaires, de deuxième génération. Le principe de ces modules repose sur le lancement de l'unité centrale suivi de plusieurs lancements de modules additionnels, dans le but de remplir des rôles spécifiques. La deuxième génération de station permet une plus grande flexibilité opérationnelle tout en se passant d'un lanceur à usage unique très puissant et donc onéreux. Le recours à ces stations a permis d'allonger la durée de vie des stations dans l'espace. C'est à partir de l'instauration des stations spatiales que de nombreux records de durée dans l'espace ont été battus par des astronautes, entraînant également de nouvelles découvertes dans les domaines de la physique, des nouvelles technologies et de la biologie, plus particulièrement sur l'adaptation de l'Homme à la microgravité.

La station Mir, placée en orbite par l'Union Soviétique en 1986 et assemblée jusqu'en 1996, fut la première station de deuxième génération occupée par une série d'équipages effectuant des séjours de longue durée. La grande majorité de l'équipage était Russe ou Soviétique, mais suite à la chute de l'URSS, la station a été rendue accessible aux astronautes Nord-Américains, Européens, Japonais, Indiens et Slovaques. Cette ouverture marque alors le début des collaborations internationales dans la conquête de l'espace.

Conçue à l'origine pour fonctionner cinq ans, la station russe est restée trois fois plus longtemps dans l'espace. Toutefois, la multiplication des incidents techniques durant les trois dernières années de service, mais surtout l'émergence du projet de station spatiale internationale (ISS), dans lequel les Russes ont un rôle majeur, a précipité la destruction de la station Mir, le 23 Mars 2001.

Ainsi, la station spatiale internationale, mise en orbite initialement le 20 Novembre 1998 à l'initiative de onze pays Européens, les États-Unis, le Canada, le Japon, la Russie et le Brésil est aujourd'hui toujours en service avec des missions prévues jusqu'en 2024-2025, extensible jusqu'en 2028. L'ISS est une réussite scientifique, politique et technologique sans précédent tant elle a permis le rapprochement de méthodes de travail et de normes différentes entre les nations. À ce jour, plus de 200 astronautes ont séjourné à bord de l'ISS avec une présence continue dans l'espace depuis 20 ans, l'ensemble des équipages participant activement à la compréhension de l'adaptation de l'Homme aux conditions de microgravité, entre autres.

### c. L'émergence de nouveaux pays spatiaux

Bien que la majorité des explorations spatiales soient effectuées par les agences américaine (NASA), russe (Roscosmos), et européenne (ESA), d'autres pays ont toujours participé et tentent de développer au mieux leur participation dans l'exploration spatiale. La Chine a montré très tôt son intérêt pour l'espace via la mise en orbite d'un satellite artificiel le 24 Avril 1970, devenant ainsi la cinquième puissance spatiale après l'Union Soviétique, les États-Unis, la France et le Japon. Suite à la politique de la République de Chine et au climat de guerre froide qui règne à cette époque, les Chinois se développent grâce à un partenariat avec l'URSS et plus tard avec la Russie. Toutefois, ce ne sera que bien plus tard, que la Chine effectuera le premier vol habité dans l'espace, en la personne de l'astronaute Yang Liwei à bord de la capsule Shenzhou 5 le 15 Octobre 2003. Cette réussite a permis d'ériger la Chine en tant que troisième puissance spatiale à lancer un homme dans l'espace par ses propres moyens, respectivement après la Russie et les États-Unis. Pour asseoir un peu plus la position de leadership mondial dans l'exploration spatiale, la Chine réalise désormais des stations spatiales. De 2011 jusqu'au 2 Avril 2018, la station spatiale Tiangong 1 était en orbite terrestre. Depuis le 15 septembre 2016, Tiangong 2, une station spatiale plus sophistiquée est également en orbite et accueille des astronautes chinois pour des missions courtes. Un futur projet de station spatiale, Tiangong 3, est à l'étude pour permettre aux astronautes de réaliser des missions spatiales de 6 mois.

L'Inde est un pays qui tente de poser sa marque dans la conquête de l'espace. Engagés dans le domaine spatial depuis les années 1960 et en développement à travers des partenariats avec la Russie, les États-Unis et la France, l'Inde a pu lancer son premier satellite très tôt dans l'histoire de la conquête spatiale, le 19 Avril 1975. Par la suite l'Inde a développé son expansion dans la conquête de l'espace par la construction de leurs propres lanceurs. Cette autonomie nationale leur a permis de mettre en orbite de nombreux satellites Indiens mais également de nombreux satellites internationaux.

Actuellement les lanceurs spatiaux sont arrivés à maturité et l'heure est à l'économie et à la rentabilité. Dans ce contexte, le marché se déplace naturellement vers les pays comme la Chine et l'Inde. En chiffre, sur l'année 2012, la Chine a par exemple réalisé plus de lancements que les États-Unis. De même l'Inde a réussi à envoyer 104 satellites en un seul lancement, le 15 Février 2017. Ces résultats montrent bien que de nouveaux pays s'intéressent à la conquête spatiale et tentent de se faire une place parmi les leaders pionniers que sont la Russie et les États-Unis.

### d. Les sociétés privées

Depuis les années 1960, les différents médias ont amené la conquête spatiale dans chaque foyer. Avec le développement de nouvelles technologies, les lancements se sont accélérés et diversifiés. Une émulation collective, nationale et internationale envahit le monde à chaque nouvelle prouesse technologique ou découverte scientifique. Fort de l'image grandissante de la conquête spatiale, des compagnies privées ont su saisir l'occasion pour entrer dans l'air du tourisme spatial. C'est ainsi qu'en 2001, Dennis Tito devint le premier « touriste de l'espace » en effectuant un vol de 7 jours avec un arrimage à la station spatiale internationale à bord de la mission Soyouz TM-32 contre la modique somme de 20 millions de dollars au profit de l'agence spatiale Russe. L'ouverture des agences spatiales pour ce genre de prestations est évidemment économique mais permet également de rendre encore plus accessible l'espace au grand public. D'une autre manière, aux États-Unis, un concours a été instauré à



partir de 1996 pour démontrer que le vol spatial pouvait être abordable et accessible aux civils et aux entreprises. Le but du concours était alors de réaliser, en l'espace de 15 jours, deux vols au-delà de l'atmosphère terrestre, soit à plus de 100km d'altitude. C'est en Octobre 2004 que le concours a été remporté par la société Scaled Composites pour le vaisseau spatial SpaceShipOne. Ce concept a d'ailleurs été repris par la société Virgin Galactic et propose aujourd'hui des vols suborbitaux nécessitant 3 jours d'entraînement et une participation financière conséquente.

Au-delà du tourisme spatial, des compagnies privées s'intéressent également à l'espace et mettent à disposition leurs compétences et leurs services pour envoyer des engins dans l'espace sous la forme de contrats avec les agences spatiales nationales. C'est le cas des sociétés Boeing et Space X, qui se sont vu confier par la NASA des contrats de transport de fret et des équipages vers la station spatiale internationale suite au retrait planifié de la navette spatiale américaine et en attendant la fin du développement du vaisseau Orion. À titre d'exemple, Space X fut la première compagnie privée à réaliser un vol orbital grâce au cargo spatial Dragon. Quelques années plus tard, en 2012, un même cargo Dragon réalise le ravitaillement de la station spatiale internationale. À partir de 2015, la société souhaite développer un système de fusées réutilisables pour permettre de diminuer les coûts des lancements spatiaux. Malgré des débuts ponctués par quelques échecs, les fusées utilisées lors des différents lancements de Space X depuis 2015 ont toujours permis de mettre en orbite les charges qu'elles embarquaient. De plus, lors d'un précédent lancement en Février 2018, Space X a réussi la récupération de deux propulseurs utilisés lors du lancement de la fusée Falcon Heavy, un nouveau lanceur lourd également développé par la société.

Le tourisme spatial et l'apport de compagnies privées dans la conquête spatiale auprès des agences nationales montrent bien que l'espace est un domaine plus que porteur et pleins de ressources. Bien que le tourisme spatial n'en soit qu'à ses balbutiements, dès maintenant et plus encore à partir de 2019, les moyens d'accès de l'Homme à l'espace seront multiples. Les compagnies privées comme Space X, Axiom Space ou encore Bigelow Aerospace pourraient se montrer très concurrentielles pour les futurs projets spatiaux. Plus encore, le transport des astronautes vers l'ISS par des sociétés privées permettrait aux agences spatiales de concentrer leurs efforts sur des missions plus ambitieuses comme le retour vers la Lune, la capture d'un astéroïde ou le voyage vers Mars.

#### e. Futures explorations et enjeux

Depuis 1972 et la fin du programme Apollo, il n'y a plus d'exploration de l'espace à l'aide de vols habités. Les nouvelles technologies ont par ailleurs permis l'envoi de sondes sur la plupart des planètes du système solaire [3]. Par ailleurs, l'utilisation du télescope Hubble, et ses multiples améliorations depuis sa mise en orbite en 1990 ont également permis à l'Homme d'explorer et d'en apprendre plus sur l'espace.

Dans un avenir proche, suite au développement du vaisseau Orion et du nouveau lanceur SLS, la NASA souhaiterait un retour de l'Homme sur l'orbite lunaire pour ensuite envisager un nouvel alunissage avant 2030. L'idée d'alunir servirait également de base pour ensuite développer une station lunaire et un spaceport orbital lunaire afin d'assembler et de tester le futur vaisseau qui partira vers la planète rouge. Il est également à prévoir que des compagnies privées comme Boeing et Space X

puissent entrer en compétition avec les opérateurs spatiaux public pour des missions habitées autour et sur la Lune à l'horizon 2025-2030.

L'Agence Spatiale Européenne (ESA) souhaiterait poursuivre l'entente internationale entreprise depuis le projet de l'ISS et songerait à un retour de l'Homme sur la Lune avec de nombreux projets en conséquence comme un spaceport... Dans un premier temps, l'envoi de robots sur la Lune permettrait de démarrer la construction des locaux lunaires via l'utilisation du sol lunaire et de la technologie d'impression 3D. Dans un second temps, le retour de l'Homme permettrait de finaliser les constructions et d'assurer la transition de la station lunaire pour un projet plus grand encore, le voyage vers Mars. Les agences spatiales et les compagnies privées ont très tôt eu en tête de programmer un voyage sur Mars. Au départ prévu à l'horizon 2020, les concernés ont reculé l'échéance d'un tel voyage à 2030 et envisage désormais d'étaler la faisabilité de ce projet entre 2030 et 2050.

Les enjeux d'un voyage vers Mars sont nombreux. Premièrement, il faut savoir que la planète rouge et la Terre sont des planètes « sœurs », nées à la même date mais aux destins bien différents. D'après les nombreuses données obtenues par les sondes et autres robots envoyés sur Mars, nous savons d'ores et déjà que cette planète possède, comme la Terre, des saisons impliquant des variations de conditions climatiques avec une alternance proche de celle de la Terre. Ainsi la compréhension du climat martien pourrait nous renseigner sur le climat passé et l'évolution du climat sur notre planète. Mars était-elle habitée par une forme de vie ? Est-ce encore le cas ? En cas de catastrophe sur Terre, la planète Mars peut-elle être habitable et habitée par l'Homme ? Que peut-on en apprendre à propos de forme de vie extraterrestre ? Peut-elle nous aider à comprendre le début de la vie sur Terre ? Peut-elle nous permettre d'en apprendre plus sur le passé, le présent et l'avenir de la planète Terre ? Les futures missions spatiales auront pour but de répondre à ces interrogations. En partant du principe que l'Homme peut vivre et travailler sur Mars, d'autres enjeux consisteront à trouver, utiliser et recycler les ressources énergétiques de la planète, et ce de manière innovante et efficace. De ces enjeux découleront la possibilité d'un voyage retour vers la Terre. En effet, un des projets retenus par la NASA consisterait à embarquer le carburant nécessaire pour le voyage aller (vers la planète Mars) tandis que le carburant nécessaire pour le retour sur Terre devrait être fabriqué à partir des ressources en gaz carbonique dont dispose l'atmosphère martienne. De même, la planète Mars est proche de la ceinture d'astéroïdes du système solaire. De ce fait, des projets d'observation et de capture d'astéroïdes pourront être développés pour étudier et prévenir les dégâts engendrés par ces comètes. Des projets futuristes sont également pensés dans le but de capturer des astéroïdes et les utiliser comme matière première exploitable.

Avec les moyens à disposition actuellement, un voyage vers Mars nécessiterait plus d'un an. En y ajoutant le temps de la mission martienne, le laps de temps nécessaire pour retrouver des conditions de vol favorables et le voyage retour vers la Terre, la durée totale du voyage se rapprocherait des 3 ans [4], soit un record absolu pour une seule mission habitée. À l'approche de 2030, il devient donc urgent d'obtenir des réponses, de développer des méthodes et de mettre en œuvre tous les moyens nécessaires pour minimiser les risques d'un tel voyage. En effet, il faut déjà parvenir à développer des lanceurs et construire des vaisseaux capables d'atteindre la planète rouge. Des systèmes doivent être mis au point pour limiter l'embarcation de nourriture et d'eau, minimiser la charge utile à bord des engins spatiaux et ainsi réduire le coût d'une telle mission. De nouveaux moyens de communications avec la Terre doivent également voir le jour. Les avancées technologiques nécessaires pour les nombreux projets

spatiaux se basent sur des technologies préexistantes qu'il faut optimiser, automatiser et où le gain d'autonomie est une priorité. De cette manière le développement et l'amélioration des technologies fondamentales à un voyage vers Mars est en passe de se réaliser avec de nombreux tests, simulations et mise en orbite au cours des prochaines années dont le but est d'être le plus indépendant des ressources terrestres. Les enjeux spatiaux pour lesquels subsistent encore une grande inconnue restent centrés autour des adaptations engendrées par la microgravité sur les astronautes eux-mêmes. En effet, voyager vers Mars implique la mise en œuvre de moyens garantissant le maintien de la santé et la performance des astronautes. Les conditions dans l'espace, au-delà de l'orbite terrestre basse, ainsi que sur la planète Mars entraîne une irradiation continue, bien supérieure aux doses reçues actuellement par les astronautes, et ce pendant les 3 ans de voyage. Des moyens doivent également être mis en œuvre sur le plan psychologique et physiologique pour limiter l'impact du confinement et de la microgravité exercés sur les astronautes. L'ambition internationale affichée par les compagnies privées et les agences spatiales soulèvent donc des inconnues qui sont autant de défis à relever et autant de nouvelles directions de recherche [3] pour permettre de prévenir et réduire les adaptations engendrées par la microgravité. La volonté est de développer de nouvelles combinaisons spatiales permettant de réduire la logistique, de suivre et de protéger les astronautes des radiations, de mettre au point de nouveaux protocoles d'activité physique et de renouveler les équipements médicaux. De nombreux projets de recherche se focalisent sur l'adaptation de l'Homme lors de missions spatiales de longue durée. Les études en cours ou à venir se concentrent sur la perte osseuse et musculaire, les effets de changements de pression intracrânienne et de la redistribution des fluides, les fonctions immunitaires, l'adaptation cardiovasculaire. De même, des études nutritionnelles ainsi que des protocoles d'exercice physique sont menés afin de mieux comprendre la physiologie humaine et préparer les missions spatiales de longue durée. Les recherches entreprises par l'intermédiaire des programmes spatiaux permettent également de favoriser le développement de nouvelles technologies, de médicaments et autres pratiques thérapeutiques innovantes qui bénéficieront à l'Homme sur Terre dans une multitude de domaines.

## 2. Les adaptations aux vols spatiaux et à la microgravité

### a. Microgravité réelle et simulée, les modèles d'études

Sur Terre, le corps humain est soumis à la force gravitationnelle qui agit le long du corps du haut du corps vers le sol. La gravité génère au sein de l'organisme une différence de pression hydrostatique et induit une localisation des fluides vers le bas du corps (70% sous le cœur). Le système musculo-squelettique supporte la force gravitationnelle terrestre et permet les changements de position et le mouvement de manière générale. De plus, le système vestibulaire détecte la gravité qui s'applique sur le corps et contrôle les différents organes par réflexe. Ces dispositions du corps humain nous permettent d'être adaptés à la vie sur Terre. En revanche, lors des vols spatiaux en orbite terrestre basse, ou lors d'explorations planétaires passées et futures, les conditions de gravité changent et les individus dans l'espace se retrouvent confrontés aux conditions de microgravité réelle. À titre d'exemple, la gravité sur Terre est de 1G tandis qu'elle est de 0,16G et 0,37G respectivement sur la Lune et sur Mars. En orbite terrestre basse, la station spatiale internationale est en orbite autour de la Terre et se trouve en chute libre, attirée par la Terre. La vitesse de déplacement de la station autour de la Terre induit une situation d'impesanteur où les astronautes échappent aux effets de leur propre poids. Cette situation place donc les astronautes en vol en situation de microgravité tout au long de leurs missions spatiales. Dans ces conditions, la charge du système musculo-squelettique et la différence de pression hydrostatique se trouve diminuée, et de nombreuses autres adaptations se mettent en place au sein des différents systèmes qui composent l'organisme humain [5] (Figure 1).

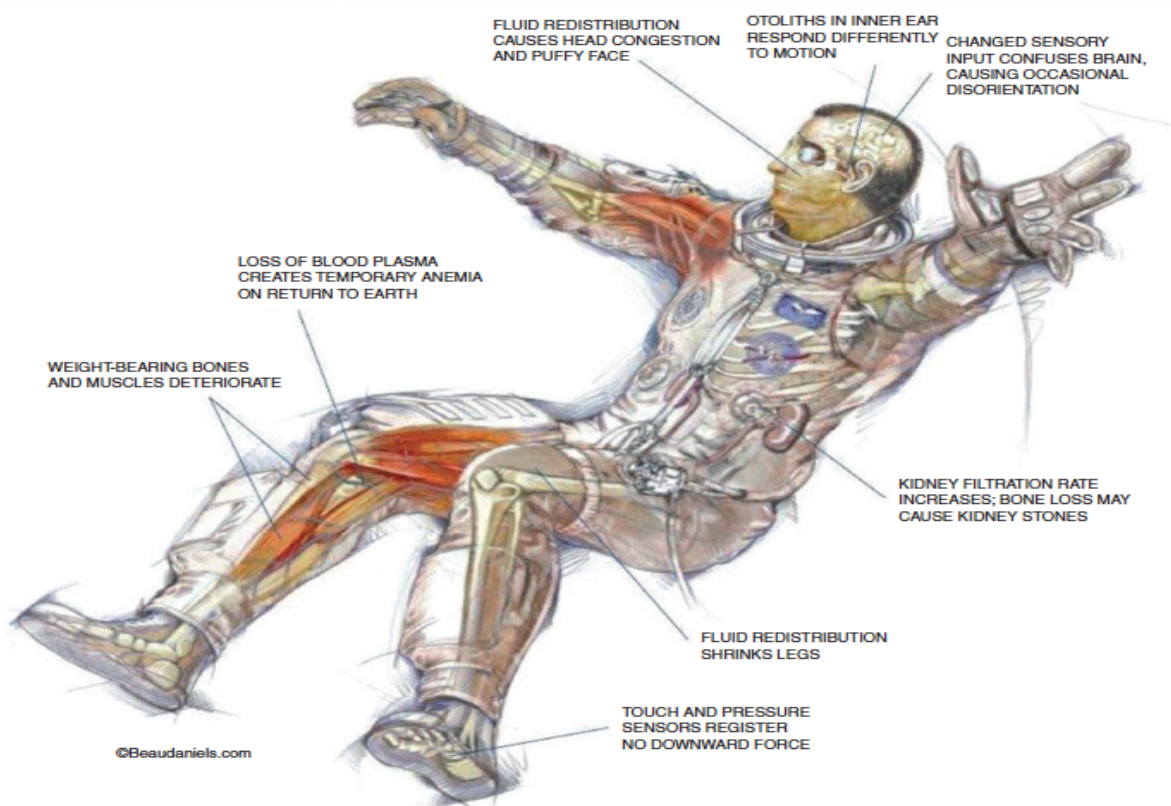


Figure 1: Effets des vols spatiaux sur le corps humain adapté de la publication de Hodkinson et al. 2017

Ces adaptations sont comparées à un vieillissement accéléré [6]. Une comparaison peut être proposée entre patients et astronautes. En effet les patients peuvent être considérés comme des individus qui vivent dans un environnement normal mais avec des dérèglements physiologiques tandis que les astronautes peuvent être vus comme des individus sains exposés à un environnement anormal [7]. De ce fait les données obtenues au cours des différentes missions spatiales ont un impact de santé publique car elles permettent de mieux comprendre les mécanismes menant aux diverses adaptations au sein des différents systèmes physiologiques soumis aux conditions microgravitaires. Toutefois, l'opportunité d'étudier la physiologie humaine pendant et après des vols spatiaux est et sera toujours délicate et limitée, bien que de nombreuses expérimentations scientifiques aient pu être menées jusqu'à maintenant sur les astronautes participant aux missions spatiales. Au-delà de la rareté relative de telles opportunités, le simple coût des vols spatiaux exige que les équipages complètent un programme très ambitieux afin de maximiser le rendement scientifique. Du fait de ces contraintes de temps, le temps alloué aux investigations physiologiques tend à être très limité. De plus, les missions spatiales ne permettent ni l'inclusion de sujets témoins (raison éthique), ni la possibilité de moduler des variables telles que l'alimentation et l'exercice. Pour ces raisons, le développement de modèles d'étude sur Terre s'avère des plus utiles pour étudier les réponses physiologiques à la microgravité dans des conditions contrôlées [8] et tester des contremesures à appliquer en vol. Pour cela les modèles d'étude doivent induire des adaptations identiques à celles ayant lieu lors de l'exposition à la microgravité spatiale. Lors des vols spatiaux, les astronautes perdent du poids, montrent une redistribution des fluides corporels vers la région thoraco-céphalique ainsi qu'une répartition différente de la pression hydrostatique et des pertes sensorielles entre autres.

Depuis de nombreuses années, différents modèles d'études sur Terre ont été développés et utilisés pour mimer les conditions de microgravité retrouvées dans l'espace, on parle alors de microgravité simulée. Les modèles d'études au sol qui se rapprochent le plus des conditions de microgravité rencontrées dans l'espace chez l'Homme sont les vols paraboliques, les études d'immersion sèche ainsi que les études d'alitement prolongé [9-11].

Les vols paraboliques sont réalisés à bord d'avions spécifiques qui réalisent des trajectoires paraboliques et permettent une alternance de courtes périodes de chute libre avec des phases d'accélération et de temps de récupération (Figure 2). Grâce à leurs caractéristiques, les vols paraboliques représentent le seul modèle terrestre capable de mettre les individus dans des conditions de microgravité complète, soit 0G. De nombreuses études ont utilisé les vols paraboliques comme stimulus physiologique pour étudier le système neuro-vestibulaire et les fonctions sensorimotrices et comprendre le « mal de l'espace ». De même, les vols paraboliques ont permis d'étudier d'autres phénomènes qui se mettent en place rapidement au cours de l'exposition à la microgravité. En termes d'adaptations cardiovasculaires, la prédominance vagale, la baisse du rythme cardiaque, les altérations du baroréflexe et des changements de pression sanguine ont été mis en évidence au cours des vols paraboliques. La redistribution des fluides vers le haut du corps et l'intolérance orthostatique, autres conséquences de la microgravité, ont été démontrées à la suite de vols paraboliques. Les vols paraboliques, en plus d'induire une vraie chute libre, sont également faciles d'accès pour les investigateurs et les volontaires participant à ces études, facilitant l'obtention de résultats et les corrections éventuelles au cours des vols. En revanche, les inconvénients de ce modèle d'étude résident dans l'interruption des phases de chute libre par des moments de fortes accélérations, pouvant mener à des résultats confus. Un autre inconvénient majeur repose sur le fait que les périodes de chute libre

n'excèdent pas trente secondes. Ces arguments interpellent sur l'applicabilité des vols paraboliques en tant que modèle d'étude pour les missions spatiales de longue durée à venir car de nombreuses adaptations et effets compensatoires engendrés par la microgravité se déroulent à des temps d'exposition beaucoup plus longs que ceux réalisables au cours des vols paraboliques.

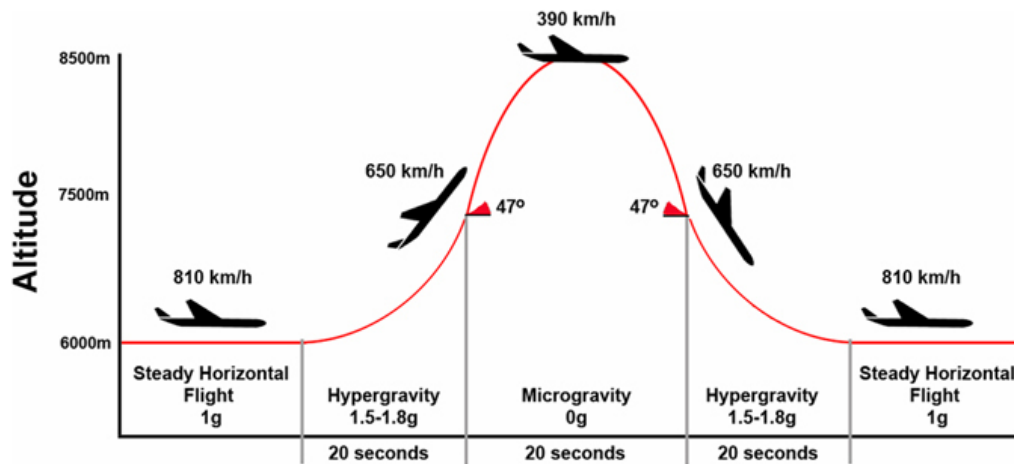


Figure 2: Représentation schématique du déroulement d'un vol parabolique.

En 1961, avec la perspective de vols spatiaux habités, l'immersion de candidats dans une eau thermoneutre a été suggérée comme modèle de microgravité car la flottaison permettait de neutraliser la force gravitationnelle sur le corps humain. Cependant, cette méthode a vite montré ces limites car il était impossible de rester plus d'un jour dans l'eau [12]. En conséquence, les scientifiques soviétiques ont développé un modèle d'immersion sèche qui consistait à immerger le corps des volontaires jusqu'au cou mais à les maintenir au sec en les recouvrant d'un tissu élastique. L'air entre la peau des sujets et le tissu entraîne une posture semi-couchée du volontaire au cours de l'immersion (Figure 3) et permet ainsi d'augmenter la durée des expérimentations en immersion [13]. Pour une courte durée, le modèle d'immersion sèche permet de reproduire fidèlement les effets physiologiques de la microgravité comme le changement de répartition des fluides corporels, une hypokinésie, une hypodynamie engendrée par une absence de soutien du corps, et des changements hémodynamiques. L'hypodynamie induit une réduction de la masse des muscles posturaux et l'hypokinésie entraîne une diminution de l'activité motrice. Au niveau cardiovasculaire, suite à l'immersion, la pression hydrostatique diminue la capacité vasculaire périphérique et augmente la perfusion sanguine [14, 15]. Ceci mène à une redistribution des fluides vers la région thoraco-céphalique et à une hypovolémie. En conséquence, le débit cardiaque se trouve augmenté, l'activité du système nerveux sympathique est quant à elle réduite. Les études montrent également une suppression du système rénine-angiotensine-aldostérone [16], une augmentation de l'expression du peptide natriurétique auriculaire (ANP) [17], une réduction du tonus vasomoteur, ainsi qu'une forte natriurèse et une diurèse [18]. Au niveau musculaire, la chute rapide (après quelques heures) du tonus musculaire, en particulier des muscles posturaux, ainsi que l'altération des afférences musculaires sont spécifiques au modèle d'immersion sèche. L'exposition plus longue à l'immersion sèche entraîne également des changements musculaires, structurels et fonctionnels comme l'atrophie, la destruction myofibrillaire et des altérations dans la composition des fibres musculaires. Une perte de force musculaire y est alors associée. Les études

démontrent que l'immersion sèche est un modèle efficace pour étudier les adaptations physiologiques induits par la microgravité en soumettant les volontaires au plus haut niveau d'inactivité physique possible tout en induisant des adaptations rapides au cours de l'immersion et un retour à la normale tout aussi rapide lors de la période de récupération. Toutefois, un autre modèle est privilégié pour simuler la microgravité au cours de périodes plus conséquentes en vue des prochaines missions spatiales de longues durées, et également dû au meilleur confort pour les participants au cours des études, à savoir l'alitement prolongé.

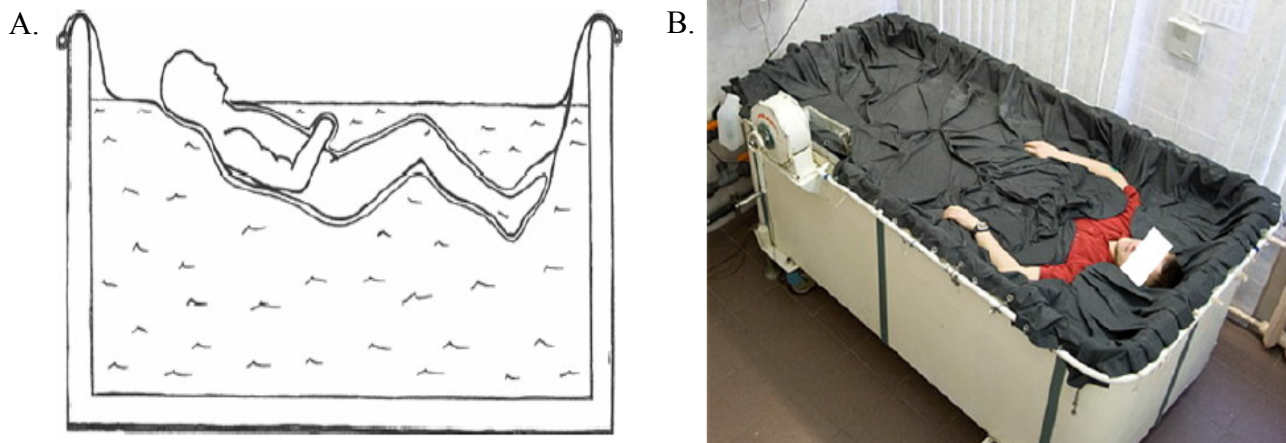


Figure 3: Représentation schématique (A) et photo (B) d'un volontaire participant à une étude d'immersion sèche.

Les premières études qui s'intéressaient à la microgravité simulée avaient pour but de fournir des informations descriptives relatives à l'exposition aux conditions spatiales et se déroulaient dès la fin des années 1940 [19]. Comme ces études se déroulaient avant même les vols spatiaux, ils n'étaient pas considérés comme modèles d'étude de la microgravité mais représentaient tout de même les premières observations comparables aux conditions spatiales [20]. L'alitement prolongé fut proposé sous deux formes, l'alitement prolongé en position horizontale puis l'alitement prolongé à tête déclive (Figure 4). L'alitement prolongé horizontal a d'abord été proposé comme modèle d'étude car il induisait une immobilisation, une inactivité physique et entraînait des changements de pression hydrostatique comme lors d'un vol spatial et permettait d'étudier les effets de la microgravité sur le système musculo-squelettique. Cependant, dans ce modèle, la répartition des fluides n'était pas déplacée vers le haut du corps, comme c'est le cas au cours des vols spatiaux. C'est la raison pour laquelle les Russes ont proposé un modèle d'alitement non plus horizontal mais à tête déclive. Plusieurs angles d'inclinaison ont été proposés à l'époque ( $-15^\circ$ ,  $-10^\circ$  et  $-5^\circ$ ) mais c'est finalement l'angle de  $-6^\circ$  qui a été retenu car il représentait le bon compromis des différentes réponses adaptatives. Par ailleurs, après leur retour de mission, les astronautes préféraient dormir dans une position tête déclive de  $-6^\circ$  pour avoir l'impression d'être à l'horizontale. L'angle de  $-6^\circ$  a donc été retenu de manière empirique sur la base des sensations rapportées par les astronautes [12]. Les différentes études d'alitement prolongé menées jusqu'à présent ont permis de mieux comprendre la variété de réponses physiologiques induites par le changement de position et l'immobilité prolongée.



Figure 4: Photo d'un volontaire lors d'une étude d'alitement prolongé tête décline à  $-6^{\circ}$  (repris de l'article de Poultz-Snyder et al. 2016)

Ce modèle induit une répartition des fluides vers le haut du corps, l'absence de changement de posture, l'absence de travail contre la force de gravité, une réduction des besoins énergétiques, une réduction des sensations proprioceptives et une perte de stimulation sensorielle globale [12]. En y ajoutant la condition de tête décline, ce modèle permet de reproduire de nombreux aspects de l'adaptation cardiovasculaire et musculo-squelettique engendrés par la microgravité [8]. À terme, les conséquences de l'absence ou de la réduction des stimuli de la gravité impactent directement ou indirectement tous les organes du corps humain. De cette manière, au cours de l'alitement prolongé tête décline, le changement de répartition des fluides, la diurèse et la natriurèse entraînent une perte du volume sanguin, qui lui mène à une baisse des performances cardiaques, à une atteinte de la sensibilité du baroréflexe et à une réduction des capacités aérobies identiques aux adaptations rencontrées dans l'espace [12]. Le poids, la masse et la force musculaire sont réduits et la résistance à l'insuline au niveau des muscles est impactée. La densité et l'architecture osseuses sont altérées et les rythmes circadiens sont perturbés. Suite à l'alitement, les volontaires manifestent une intolérance orthostatique, des problèmes d'équilibre ou encore une perte de coordination. Une comparaison des changements physiologiques qui se mettent en place dans l'espace et au cours d'une étude d'alitement est proposé (Figure 5).



|                           | Space   | Bed rest (HDBR)                      |
|---------------------------|---|--------------------------------------|
| Height                    | ↑ ± 1.3 cm  | ↑ ± 1.0 cm                           |
| Body mass/weight          | ↓ 3-4%  | ↓ 2-4%                               |
| Maximal aerobic capacity  | Not measured                                      | ↓ 25%                                |
| Plasma volume             | ↓ 10-15%  | ↓ 10-15%                             |
| Urinary calcium           | ↑   | ↑                                    |
| Bone density              | ↓ 1.6%/month                                      | ↓ 0.5-1%/month                       |
| Absorption of Ca from Gut | ↓   | ↓                                    |
| Renal stone risk          | ↑   | ↑                                    |
| Muscle mass               | ↓   | ↓                                    |
| Muscle strength           | ↓   | ↓                                    |
| Insulin resistance        | ↑   | ↑                                    |
| Nausea/sickness/vertigo   | None 35%<br>Severe 7%<br>Moderate 23%<br>Mild 35% | Vertigo 10%<br>Nausea rarely present |

|                          | Post-flight | Post-bed rest |
|--------------------------|-------------|---------------|
| Maximal aerobic capacity | ↓ ±12%      | ↓ 20-25%      |
| Orthostatic hypotension  | ↑           | ↑             |
| Balance/stability        | ↓           | ↓             |
| Coordination/gate        | Poor/wide   | Poor          |

Figure 5 : Comparatif des altérations rencontrées dans l'espace et suite à un alitement prolongé adapté de Nicogossian et al. 1994 et Pavy-Le Traon et al. 2007.

Au cours des études d'alitement prolongé, les volontaires alités peuvent se tourner sur le côté de leur lit pour manger et plier les genoux, cette dernière position ne faisant que renforcer le déplacement des fluides vers le haut du corps. L'alitement prolongé permet également d'étudier les adaptations de la microgravité bien plus longtemps que lors de vols paraboliques ou d'études d'immersion sèche. De cette manière, en comparaison des autres modèles existants, l'alitement prolongé à tête déclinée s'avère être le meilleur modèle d'étude de la microgravité pour la plupart des adaptations physiologiques causés par les vols spatiaux et est le modèle le plus utilisé actuellement, en particulier pour les études de plus longue durée [13].

Par ailleurs, d'autres modèles ont été développés pour étudier les effets du confinement et de l'isolement au cours des vols spatiaux. Les études de confinement ne sont pas des modèles d'études de microgravité simulée mais sont essentielles à la compréhension et la gestion des équipages envoyés en mission spatiale où les astronautes se retrouvent au sein du même environnement pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois. L'aspect social et psychologique est primordial pour le bon déroulement des missions spatiales et les études de confinement, comme l'expérience Mars 500 par exemple, sont des modèles d'études au sol indispensables pour mieux comprendre et éviter les risques imputables à toute mission en orbite et préparer au bon déroulement des futures missions d'exploration spatiale de longue durée.

Au-delà des modèles d'études sur l'Homme, d'autres modèles, animaux cette fois, sont également très utiles pour comprendre l'impact de la microgravité. Ces modèles reposent sur l'immobilisation et le déchargement des pattes arrière des animaux par traction de la queue de rats et de souris spécifiquement (Figure 6). Ce modèle a été développé dans les années 1980 pour permettre l'étude des mécanismes, les réponses et proposer des traitements relatifs aux adaptations engendrées par la microgravité.



Figure 6 : Dessin du modèle de souris suspendue

La position de l'animal suspendu par la queue ne supprime pas la force gravitationnelle mais le déchargement des pattes arrière entraîne des réponses au niveau du système musculo-squelettique ainsi qu'un changement de répartition des fluides et des organes vers la tête de l'animal et entraîne alors une cascade de changements physiologiques au sein des différents systèmes de l'animal, affectant également le métabolisme. En particulier, les résultats des études menées sur l'animal avec ce modèle ont montré, entre autres, une atrophie musculaire au niveau des membres suspendus ou membres dits « antigravitaires », une perte de densité osseuse, une utilisation préférentielle des glucides en lieu et place de l'oxydation des acides gras au sein de muscles oxydatifs ainsi que le développement d'une insulino-résistance. Des adaptations cardiovasculaires ont également été mises en évidence grâce au modèle de rats suspendus. Des études rapportent une réduction de la  $VO_2$ max des animaux après suspension, une hypovolémie, le développement d'une tachycardie au repos et à l'exercice et une intolérance orthostatique. De cette manière le modèle de rat suspendu fut et est toujours utilisé pour mieux comprendre l'influence de l'environnement spatial sur les réponses physiologiques, organe-spécifique et de manière plus mécanistique. Les inconvénients de ce modèle animal sont liés à l'inconstance des réponses suite au stress de l'animal en fonction des expérimentations menées mais aussi à l'absence de suspension pour les pattes avant de l'animal ou encore le manque de clarté sur l'influence de la suspension sur la colonne vertébrale de l'animal. De même, bien que ce modèle entraîne une hypodynamie et une hypokinésie, il n'est pas pour autant un modèle d'inactivité physique car les animaux suspendus sont constamment en mouvement sur les pattes avant. Enfin, ce modèle reste animal et comporte donc des différences avec les essais cliniques humains, et nombre de recherches précliniques ne sont pas confirmés lors d'études cliniques. Toutefois, le modèle animal possède de nombreux avantages. Il permet une plus large marge des protocoles qui permettent ainsi d'étudier l'exposition des animaux aux radiations, à des pathogènes ou à des traitements médicamenteux, qui seraient impossibles ou très difficiles à mettre en place au cours de protocoles cliniques chez l'Homme. Le modèle animal permet également l'utilisation de souches d'animaux génétiquement modifiés ou encore d'étudier la récupération des animaux suite à la suspension, ce qui

est indispensable pour déterminer les effets à long-terme de la microgravité en vue des futures missions spatiales habitées. Le modèle de suspension animale est donc un bon analogue permettant de simuler les conditions de microgravité et donne également accès à des données complémentaires sur l'effet de l'inactivité physique et la contribution des comportements sédentaires au développement de maladies chroniques ; il est donc utile non seulement comme modèle d'étude de la microgravité mais aussi pour des questions médicales et de santé publique [21, 22]. Depuis le début des programmes spatiaux, les données scientifiques obtenues en vol comme en simulation à travers les différents modèles d'étude décrits plus haut ont permis de mieux comprendre et de décortiquer les différents mécanismes d'adaptations induits par la microgravité. Ceux-ci sont détaillés dans les paragraphes suivants.

#### b. Conséquences des vols spatiaux

L'espace est un environnement extrême pour le corps humain [23]. Depuis plus de 50 ans d'exploration spatiale humaine, les études ont montré que l'Homme pouvait s'adapter aux conditions spatiales tout en restant productif pendant plusieurs mois [24]. Les problèmes engendrés par les conditions spatiales ont été à l'étude avant les premiers vols spatiaux grâce à l'aviation. Les conditions en vol impliquent des changements de pression, des changements de position du corps forcés et la dépendance à l'équipement de survie. Cependant, les conditions spatiales réunissent des conditions uniques d'exposition à une combinaison de stimuli de stress comme les forces d'accélération, les radiations, la microgravité [23] ainsi que l'isolement. En particulier, la microgravité est une caractéristique critique des vols spatiaux. En effet, les conditions spatiales réduisent considérablement l'utilisation du corps, on parle alors d'hypodynamie et d'hypokinésie, à la base de nombreux effets sur la physiologie humaine, encore inattendus au début de l'exploration spatiale, et qui affectent l'ensemble des systèmes physiologiques. Ces réponses physiologiques engendrent un déconditionnement pouvant affecter la santé et les performances des équipages et ainsi compromettre à la fois le succès des missions spatiales et un retour sur Terre en bonne santé des Astronautes [24].

#### i. Exposition aux radiations

L'exposition aux radiations cosmiques est un des problèmes majeurs rencontrés par l'Homme au cours de l'exploration spatiale [25]. Sur Terre, l'atmosphère nous protège des radiations cosmiques, mais l'exposition aux radiations augmente avec l'altitude, soumettant les astronautes à des taux de radiations plus élevés [26]. À titre de comparaison, au niveau de la mer, l'Homme est exposé à une dose de 0,03  $\mu\text{Sv/h}$ , en montagne, la dose reçue est de l'ordre de 0,1  $\mu\text{Sv/h}$  à 2000m d'altitude et atteint 1  $\mu\text{Sv/h}$  dans les chaînes de montagne de l'Himalaya, ce qui correspond à la dose reçue par un patient soumis à des rayons X lors d'une analyse de composition corporelle par exemple. Dans l'espace, les astronautes sont quant à eux exposés à des doses beaucoup plus importantes qui avoisinent les 40  $\mu\text{Sv/h}$ . En orbite basse, la ceinture de Van Allen permet tout de même une protection face aux rayonnements. En revanche, ces mêmes radiations deviendront réellement problématiques pour les futures missions, particulièrement pour un voyage vers Mars. Les radiations rencontrées dans l'espace existent sous forme d'éruptions solaires et de rayons cosmiques [27], responsables de morbidité aigüe ou tardive. Une exposition à des radiations peut entraîner directement des vomissements, des nausées tandis que l'effet tardif d'une exposition aux radiations peut entraîner le développement d'un cancer

[23]. Des données obtenues à partir des stations Mir et de l'ISS suggèrent que la fréquence des mutations est augmentée suite à une exposition aux radiations pendant plus de 180 jours en condition de microgravité [25]. Ainsi plus la mission serait longue, plus le nombre de cellules cancéreuses retrouvées serait important. Le nombre de mutations diminuent quelques années après un vol spatial sans pour autant revenir au nombre de mutations obtenues avant tout vol spatial. Par ailleurs, un second vol n'a pas pour conséquence une nouvelle augmentation du taux de mutations, suggérant la possibilité d'une réponse radio-adaptative. En dehors des cancers ou des effets aigus d'une exposition, 48 cas d'opacification des yeux d'astronautes ont été recensés sur les 295 astronautes inclus dans le suivi longitudinal sur la santé des astronautes de la NASA, mettant en évidence la possibilité de développer des cataractes chez les astronautes. Enfin, l'exposition aux radiations peut également causer le développement de maladies cardiovasculaires comme une maladie coronarienne. Du fait de la latence entre l'exposition et les symptômes de la maladie, les astronautes sont à risque pour le développement de ces maladies bien après leur retour sur Terre [28], comme pour les cancers. Les études qui se sont intéressées à l'impact des radiations au cours des vols spatiaux font état de l'hétérogénéité des doses de radiations reçues par les astronautes au cours des différentes missions. Cette hétérogénéité pourrait s'expliquer par les différences matérielles des missions de la fin des années 1960 à aujourd'hui mais peuvent s'expliquer également par la libération de fortes doses aiguës de radiation au cours d'éruptions solaires occasionnelles. Ainsi, les risques réels d'exposition aux radiations sont difficilement évaluables et il est nécessaire de trouver un moyen de protéger au mieux les équipages au cours des missions spatiales en ayant recours à des matériaux qui allient haute protection, moindre coût et faible poids [29]. Au vu de l'ambition des projets spatiaux à court, moyen et long terme, l'exposition des astronautes aux radiations au cours de ces prochaines missions dépasserait le seuil limite de 3% de décès dû à l'exposition [30], augmentant ainsi le risque sur la santé des astronautes ce qui représente un défi majeur pour un voyage vers Mars.

## ii. Adaptations psychologiques

Les astronautes envoyés en mission spatiale sont soumis à un stress et à des altérations psychomotrices et cognitives qui peuvent se manifester sous formes d'illusions optiques, de désorientation, de problèmes d'équilibre, d'adaptations sensorielles et motrices au cours de la mission spatiale mais également lors du retour sur Terre. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces perturbations. Tout d'abord, la microgravité entraîne des effets sur le fonctionnement du cerveau, plus particulièrement sur les systèmes vestibulaires et moteurs. De plus, le stress induit par la perturbation des rythmes circadiens (manque de sommeil)[31], la charge de travail ainsi que le stress physique et émotionnel dû aux conditions de vie au sein du vaisseau spatial [32, 33] expliquent ces adaptations. Différentes études ont permis et permettent de mieux comprendre les altérations engendrées par le confinement et rendent possible l'élaboration de mesures préventives. Les modèles d'étude terrestre du confinement comme « Mars 500 » en Russie, « Envihab » en Allemagne, ou encore les expéditions en Antarctique offrent une opportunité unique d'étudier chaque aspect des conditions spatiales sans les conditions réelles et complexes des vols spatiaux.

### iii. Conséquences du confinement

L'expérience Mars 500 a induit un stress neuroendocrinien, une perturbation du système endocannabinoïde, et une élévation des taux de cortisol et catécholamines salivaires des participants [34]. Le manque de lumière naturelle cause également un décalage des rythmes circadiens, une augmentation du pourcentage de périodes de sommeil et de repos, une réduction de la qualité du sommeil et une altération de l'alternance entre phases d'éveil et de sommeil. Ces derniers résultats sont à mettre en parallèle avec des perturbations de l'humeur et une réduction du taux d'émotions positives au cours du confinement [35]. Les volontaires ressentent différents symptômes comme des maux de tête, des troubles gastro-intestinaux, de la fatigue, des troubles cognitifs (perte de mémoire, perte de vigilance, difficulté de concentration), des signes de dépression et une forme de tension envers les autres membres. Ces symptômes se rapprochent du « syndrome de l'hiver » connu comme une forme de dépression [36]. Ainsi, l'isolement et le confinement rencontrés au cours des missions spatiales soumettent le corps humain à des nombreuses contraintes psycho-neuroendocriniennes qui induisent des symptômes physiopathologiques. Les modèles d'étude terrestres offrent d'excellentes conditions pour étudier les effets du confinement et ainsi préparer au mieux les astronautes pour les missions spatiales de courte ou de plus longue durée. Pour prévenir les conditions de stress les astronautes pratiquent l'entraînement autogène mais l'élément clé reste la capacité des différents membres de chaque équipage à s'intégrer et interagir avec les autres astronautes pour instaurer une dynamique de groupe, vitale, pour le succès des missions [37]. De même, la prévention en vol s'avère plus efficace que toute approche thérapeutique. La prise de repas équilibrés comprenant des suppléments diététiques [38, 39] ainsi que la pratique d'une activité physique [40, 41] a été recommandée à travers différentes études.

### iv. Impact sur le système immunitaire

Parmi l'ensemble des contraintes causées par les voyages en orbite, la dérégulation du système immunitaire est un risque pour les astronautes au cours des missions d'exploration spatiale. L'ensemble des stress subis par les astronautes, à l'approche du décollage et en vol, peut aboutir à une modulation importante du système immunitaire, réduisant les défenses des astronautes face aux infections (bactérienne ou virale) et pouvant mener à une immunodéficience, des allergies, ou des maladies auto-immunes, compromettant ainsi les possibilités d'une exploration spatiale à long-terme [42]. De nombreuses études font état de changements conséquents au niveau du système immunitaire tels qu'une altération des taux d'immunoglobulines, des modifications de production de cytokines ou encore une réduction de l'activité cytotoxique des cellules Natural Killer (NK) [7, 43]. Parmi les cellules responsables des défenses immunitaires, les lymphocytes ont des rôles multiples et de nombreuses populations lymphocytaires peuvent être affectées par la microgravité. En effet, des études ont montré que le nombre de lymphocytes Helper CD4+ était réduit avec ou sans utilisation d'activateurs de lymphocytes T [44, 45]. Des données réalisées en vol démontrent également des changements de croissance et de pathogénicité de différents micro-organismes [45]. Enfin, l'une des perturbations du système immunitaire souvent rencontrée en situation de microgravité réside dans la réactivation de virus latents, comme le virus de l'Herpès, le virus d'Epstein-Barr ou le cytomégalo virus [7, 42]. Les expériences de confinement causent également des perturbations du système immunitaire.

Des volontaires montrent une élévation du taux de lymphocytes T CD3+ ainsi qu'une altération de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  après stimulation par le virus Epstein-Barr (EBV) témoignant d'une perturbation de la réponse immune adaptative [46]. Une autre étude rapporte une réduction de plusieurs cytokines anti-inflammatoires (IL-10 ET IL-1RA) ainsi qu'une élévation du taux de lymphocytes T-helper CD4+ (TH1) [47]. En prenant en considération le fait que le système immunitaire représente un des systèmes les plus étendus du corps humain, avec de nombreuses connexions entre les organes par voie humorale ou neuronale, il apparaît évident que des altérations du système immunitaire au cours de missions spatiales de longue durée pourrait représenter un risque clinique pour les astronautes et qu'il est donc primordial de comprendre les mécanismes qui sous-tendent ces altérations tout en développant des moyens permettant de prévenir directement ou indirectement les dommages de la microgravité sur le système immunitaire. Dans ces adaptations immunitaires le niveau de stress perçu par les astronautes joue un rôle critique. Pour cela, la nutrition, l'exercice physique, la vaccination, mais également des approches psychologiques peuvent s'avérer bénéfiques à la fois aux astronautes mais aussi à l'ensemble des individus soumis à des périodes de stress aigu ou chronique [45].

### c. Adaptations causées par la microgravité

#### i. Le système cardiovasculaire

La gravité terrestre implique une répartition des fluides corporels (sang, eau) en majorité sous le cœur [48]. Au contraire, dans l'espace, la distribution des fluides devient thoraco-céphalique, ce qui se traduit par un gonflement du visage et des jambes plus fines chez les astronautes en vol [49]. Par exemple, la pression artérielle moyenne au niveau du cœur est normalement d'environ 100 mmHg (Figure 7), alors que celle de la tête est légèrement inférieure (70 mmHg) et celle des pieds est beaucoup plus grande (environ 200 mmHg). Lors de l'exposition à la microgravité, tous les gradients de pression sanguine (artériel, veineux et microcirculatoire) sont perdus, de sorte que le sang passe immédiatement des tissus du thorax vers la tête [50].

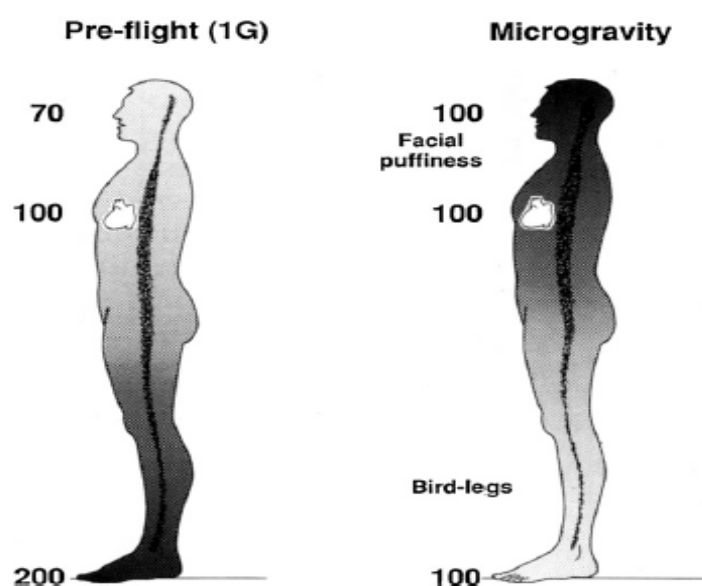


Figure 7 : Représentation de la pression artérielle moyenne pour un individu soumis à la gravité terrestre et en condition de microgravité. Adapté de Watenpugh et Hargens, 1996.

Associé à la redistribution des fluides, la perméabilité capillaire augmente et induit une migration des fluides intravasculaires vers l'espace extracellulaire [51]. En conséquence, le volume de plasma est réduit (hypovolémie) et s'accompagne d'adaptations physiologiques comme l'intolérance orthostatique et la réduction de la capacité d'exercice [52]. Ces dernières ont lieu dès les premiers jours d'exposition à la microgravité et se maintiennent tout au long des missions spatiales des astronautes. Le retour à la gravité terrestre rétablit la répartition des fluides et permet aux astronautes de retrouver les constantes cardiovasculaires dont ils disposaient avant leur vol spatial après plusieurs semaines [49].

Les données accumulées depuis 1960 montrent que les conséquences de l'exposition à la microgravité sont multiples au niveau du système cardiovasculaire. Différentes études ont démontré des altérations à la fois sur la forme [53, 54] et la masse du cœur lui-même [55, 56], des perturbations des fonctions cardiaques allant jusqu'à provoquer des arythmies ainsi que des dérégulations vasculaires différentes au niveau des membres inférieurs et des membres supérieurs [57]. Dès les premiers jours d'exposition une hypervolémie thoracique est détectée par les barorécepteurs cardiaques, menant ensuite à une diminution du volume sanguin par augmentation de la diurèse [58-61]. L'hypovolémie entraîne alors un remodelage ainsi qu'une atrophie cardiaque. Des études en vol ont prouvé que le cœur de quatre astronautes avait changé de forme lorsqu'ils étaient soumis aux conditions spatiales, montrant des dimensions diastoliques réduites et une augmentation de la sphéricité cardiaque ainsi qu'une perte de masse ventriculaire [54]. Des analyses menées lors d'un alitement prolongé de six semaines ont, quant à elles, permis de mettre en évidence une perte de masse des ventricules gauche et droit à partir d'imagerie par résonance magnétique (IRM) [55, 56, 62]. Ce phénomène serait expliqué par l'hypovolémie mais certains auteurs estiment que la réduction de masse ventriculaire pourrait également provenir d'une perte de masse myocardique [55, 62]. L'exposition à la microgravité induit également une réduction de l'apport sanguin au niveau cérébral, provoquant généralement une perte de connaissance, plus connue sous le terme d'hypotension ou intolérance orthostatique. Cette dernière peut également se manifester sur Terre lors d'une transition trop rapide entre une position assise ou couché à une position debout. Bien que cette intolérance orthostatique n'ait pas affecté le succès des missions spatiales, le fait est que ce phénomène pourrait entraver une évacuation d'urgence en cas de problème d'atterrissage de la capsule spatiale [49].

Il a également été prouvé que le rythme cardiaque, le débit cardiaque mais aussi les pressions systoliques et diastoliques sont influencées par la microgravité. En effet, le rythme cardiaque des astronautes est plus faible dans l'espace que sur Terre. Le débit cardiaque augmente légèrement à l'exposition microgravitaire tandis que les pressions systoliques et diastoliques sont réduites contribuant à une tension artérielle réduite au cours de vols spatiaux, proche de celle d'un individu en position allongée [57, 63]. Une réduction du baroréflexe contrôlant le rythme cardiaque [64] et une augmentation de l'activité nerveuse sympathique [65] ont également été mis en évidence au cours de différentes études de microgravité simulée et au cours de missions spatiales. De plus, des publications ont mis en évidence une réduction des capacités contractiles du cœur [57, 66, 67] bien que les mécanismes impliqués dans ce phénomène nécessitent encore des recherches [57]. Enfin, des arythmies cardiaques ont également été observées suite à l'exposition à la microgravité. Elles sont caractérisées par des contractions ventriculaires et/ou atriales prématurées ainsi que par une augmentation de l'intervalle de temps entre le début du complexe QRS (dépolarisation ventriculaire qui permet la contraction des ventricules) et la fin de l'onde T (repolarisation ventriculaire), soit une prolongation de l'intervalle QT au cours d'un électrocardiogramme, en comparaison à un examen

classique (Figure 8). Plus encore, la prolongation de l'intervalle QT peut augmenter le risque de torsades de pointes et induire un trouble de la repolarisation du myocarde [68].

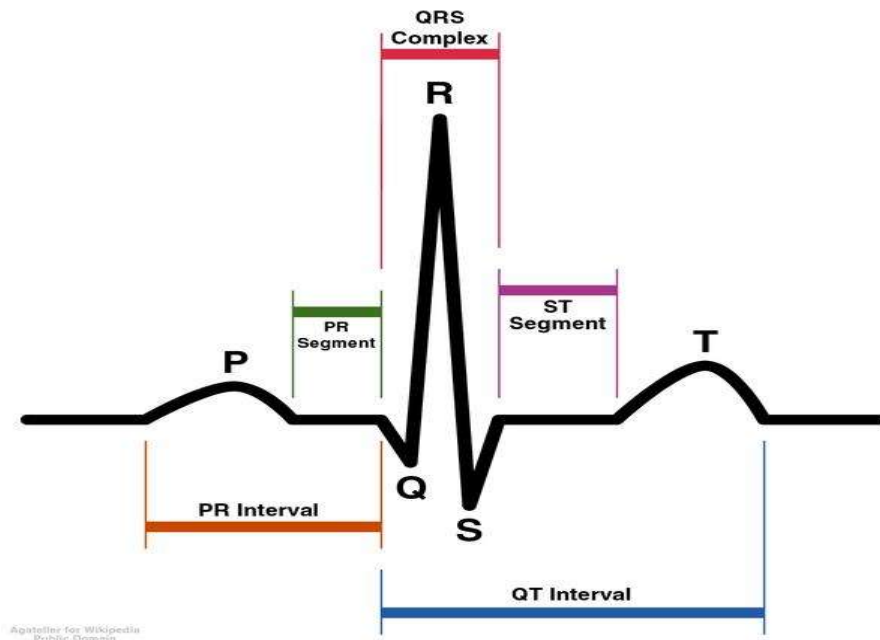


Figure 8 : Schéma d'un électrocardiogramme normal permettant de visualiser l'onde P, l'espace PR, le complexe QRS, le segment ST, l'onde T et l'intervalle QT au cours d'une contraction cardiaque.

Les arythmies peuvent être expliquées par la bradycardie au cours de vols spatiaux de longues durées, par des changements au sein du système nerveux autonome (nerf vague en particulier), mais aussi par des altérations des fonctions contractiles. Il ne faut pas non plus négliger le possible impact de la prise de médicaments au cours des missions spatiales qui peuvent induire des altérations cardiovasculaires [57].

La microgravité altère également les vaisseaux périphériques au niveau des membres inférieurs et supérieurs. Au niveau des membres inférieurs, les vols spatiaux peuvent impacter la résistance vasculaire [57]. Des études ont montré que la résistance vasculaire des membres inférieurs était diminuée au cours d'une mission spatiale de 6 mois. Au cours de cette même mission, après une semaine de vol, la section transversale de la veine fémorale avait augmenté [69]. De plus, des altérations de tonus vasculaire ont été mises en évidence au cours des vols spatiaux. Une réduction des capacités de constriction des gros vaisseaux situés au niveau des membres inférieurs a été observée, aboutissant à une dérégulation du flux artériel et une réduction de la stabilité orthostatique [70]. Toutefois la modification du tonus artériel dépendrait du temps de mission puisque le tonus artériel apparaît diminué au cours des vols spatiaux de courte durée mais semble augmenté au cours de missions spatiales plus longues [55]. Ces altérations peuvent être causées par un remodelage local des parois artérielles qui a d'ailleurs un rôle dans l'intolérance orthostatique. Au-delà des artères, les veines des membres inférieurs subissent également les effets de la microgravité. La redistribution des fluides au cours de l'exposition à la microgravité induit une moindre circulation sanguine au niveau des membres inférieurs et donc une réduction du remplissage des veines des membres inférieurs [71]. La



compliance des veines des membres inférieurs augmente en début de vol puis tend à diminuer au cours du vol, tout en gardant des niveaux plus élevés que ceux obtenus avant le départ en mission. Ces changements de compliance sont favorisés par l'altération de la structure et la fonction des vaisseaux mais aussi la réduction du tonus musculaire des membres inférieurs. Du fait de la compliance élevée des veines des membres inférieurs, plus de sang stagne au niveau des membres inférieurs diminuant ainsi le flux sanguin retournant à l'oreillette droite. Ceci induit une réduction du débit cardiaque et de la tension artérielle. Ainsi, l'altération de compliance des veines au niveau des membres inférieurs est un des mécanismes contribuant à l'intolérance orthostatique au cours de l'exposition à la microgravité réelle ou simulée [72]. Les changements de pression hydrostatique (gravitationnelle) induits par la microgravité entraînent une diminution de la pression veineuse au niveau des membres inférieurs. Par ailleurs, l'inactivité physique et l'atrophie musculaire causent une réduction du flux des veines des membres inférieurs. L'absence de stimulation gravitationnelle du système cardiovasculaire aboutit à une réduction de l'autorégulation des veines. La combinaison de ces effets a pour effet de réduire les capacités contractiles des muscles lisses, de réduire l'innervation et d'induire l'atrophie de la paroi des vaisseaux, ce qui aggrave encore les altérations des veines des membres inférieurs au cours de l'exposition à la microgravité [57].

La régulation des vaisseaux du haut du corps est également modifiée par la microgravité. Une attention particulière a été portée à la circulation cérébrale. Les études font état d'une réduction de la vitesse du flux sanguin systolique au niveau de l'artère cérébrale moyenne droite après allitement en position anti-orthostatique [73]. D'autres études ont prouvé que la microgravité induit une augmentation de la pression sanguine de 10% et un gain de 10 mmHg au sein de l'artère carotide en comparaison des données obtenues sur Terre ; ou encore une augmentation de la résistance vasculaire cérébrale et une diminution du flux sanguin cérébral. Au-delà de la circulation vasculaire cérébrale, des études se sont aussi intéressées aux régulations vasculaires au niveau des membres supérieurs. Conformément à la répartition thoraco-céphalique des fluides corporels, une augmentation du volume des fluides au niveau des avant-bras a été démontrée. Pour autant la résistance vasculaire et le remplissage des vaisseaux se trouvaient inchangés [57].

D'après l'ensemble de ces données, la microgravité, réelle ou simulée, a des effets significatifs sur les fonctions cardiaques et vasculaires. Une diminution de la capacité à l'exercice, couplée aux phénomènes ci-dessus entraînent un déconditionnement cardiovasculaire et induit des adaptations au sein du corps humain, représentant un risque pour les astronautes.

Avec l'allongement des missions, l'augmentation des missions extravéhiculaires et l'augmentation de l'intensité des activités, la santé et la sécurité des astronautes sont et seront mises à mal au cours des prochaines missions spatiales. De cette manière les recherches sur les adaptations du système cardiovasculaire en condition de microgravité sont d'une importance capitale. Par ailleurs, à l'aube de l'émergence des vols orbitaux commerciaux et des voyages spatiaux suborbitaux, tous les facteurs de risque doivent être correctement évalués.

Les prochaines études menées dans ce domaine sont et seront dirigées afin de mieux comprendre les processus physiologiques sous-jacents et développer des contremesures permettant de contrebalancer les effets de la microgravité tels que la réduction des capacités aérobie et l'intolérance orthostatique. Il sera aussi question de comprendre les changements du système nerveux autonome induits par la microgravité qui impacte le cœur et les vaisseaux périphériques.

## ii. Le système squelettique

Depuis les missions Skylab lancées dans les années 1970 jusqu'aux missions les plus récentes, des données sont collectées pour comprendre l'impact de la microgravité sur le système musculo-squelettique. Sur la base des résultats obtenus à ce jour, une exposition prolongée à la microgravité affecte le système musculo-squelettique, causant particulièrement, une perte de la masse osseuse (démminéralisation osseuse) et ainsi qu'une perte de masse musculaire due à une réduction de sollicitation et une diminution de perfusion des muscles et des os [11]. Sur un modèle de rats suspendus, Collieran et al. ont démontré une augmentation de la masse osseuse des pattes avant et une perte osseuse au niveau des pattes arrière des animaux suspendus. Plus encore, ces changements de masse étaient proportionnels aux changements de perfusion osseuse, corroborant l'hypothèse que les modifications de perfusion sanguine sont en partie responsables du remodelage osseux en situation de microgravité [74]. Les missions Skylab ont montré une augmentation de l'expression de marqueurs de résorption osseuse tels que l'hydroxyproline et le télopeptide N-terminal, NTX (augmentation de l'ordre de 100-150% en vol en comparaison des taux obtenus avant le vol spatial). De même, après 14 jours d'alitement à  $-6^\circ$ , Smith et al. ont montré une augmentation de l'expression de marqueurs de résorption osseuse, dont le marqueur NTX [75]. Une réduction de la balance calcique a également été démontrée au cours des différentes missions Skylab. Le vol de 84 jours à bord de Skylab a induit une perte moyenne dans la balance calcique 200mg/jour et les pertes osseuses n'étaient pas également réparties sur l'ensemble du squelette des astronautes. Les résultats montrent une perte osseuse plus importante au niveau du rachis lombaire, du col du fémur, du trochanter, du pelvis, du calcaneus et des jambes tandis que les os des bras n'étaient pas affectés [76]. Des données similaires ont été obtenues suite à un alitement prolongé de 17 semaines consécutives [77, 78]. Ainsi la perte osseuse est plus importante au niveau des os qui supportent la charge corporelle en condition de gravité terrestre. Les résultats issus des missions Soyuz et Mir ont confirmé les résultats précédents et ont également démontré des variations d'un marqueur de formation osseuse, l'ostéocalcine, résultats en adéquation avec des résultats obtenus sur modèle animal [79]. En effet, l'expression de ce marqueur osseux augmente significativement dans le sang après 14 jours en vol mais sa concentration sanguine diminue après un séjour de 110 jours des astronautes dans l'espace. À titre de comparaison, les taux de perte osseuse d'astronautes ayant passés 6 mois à bord de l'ISS sont du même ordre que ceux retrouvés au sein d'individus dont l'âge est compris entre 50 et 60 ans [23].

Plus encore, les résultats de la mission Mir-18 ont mis en évidence une réduction significative de l'expression de la vitamine D et de son précurseur, induisant une réduction de la fixation d'ions calciques sur les os. Au retour sur Terre, l'expression de l'hormone parathyroïdienne, favorisant la résorption osseuse, se trouvait augmentée et était donc préjudiciable à la restauration osseuse des astronautes après leur mission. Toutefois, les pertes osseuses (ainsi que l'expression des marqueurs osseux associés) engendrées par les différentes missions spatiales tendent à s'estomper avec le temps mais cette restauration osseuse reste dépendante du temps passé dans l'espace. De cette manière un(e) astronaute revenu(e) d'une mission spatiale plus courte mettra moins de temps pour restaurer sa masse et sa densité osseuse par rapport à un(e) astronaute ayant eu une mission plus conséquente. Au-delà des altérations osseuses, la microgravité induit également des pertes fonctionnelles au niveau du cartilage, des tendons ou encore des disques intervertébraux[80].

### iii. Le système musculaire

Comme le squelette, sans les forces exercées par la gravité terrestre, les muscles sont fortement impactés au cours des vols spatiaux. Toute atteinte musculaire s'avère préjudiciable en cas de sortie extravéhiculaire ou autres activités quotidiennes et pourrait à terme compromettre la réussite des missions spatiales [8]. Jusqu'à maintenant, les équipages engagés dans les missions spatiales, à bord de véhicules ou habitant temporairement dans les stations spatiales, n'étaient qu'à quelques jours de voyage pour un retour sur Terre. En revanche, en cas de déficience musculaire, les futures missions interplanétaires impliqueraient une impossibilité de retourner sur Terre rapidement. Il apparaît alors fondamental de comprendre les adaptations qui impactent le système musculo-squelettique en situation de microgravité. Au-delà de l'impact pour les futures missions spatiales, la compréhension de ces adaptations est également un enjeu majeur de santé publique dans nos sociétés occidentales de plus en plus sédentaires.

Il est établi qu'une atrophie musculaire se produit chez les astronautes [52] conjointement à une perte de performance dès les premières semaines d'exposition aux conditions microgravitaires et qu'une réduction du taux de perte musculaire se met en place les semaines suivantes. La perte musculaire engendrée par la microgravité dépend du temps passé dans l'espace et de la taille des fibres et de la masse musculaire des individus avant leur vol spatial. Les données obtenues en vol, mais aussi les résultats d'études au sol au cours d'alitement prolongé ou sur des modèles de rat suspendu démontrent la présence d'une atrophie musculaire en particulier au niveau des membres inférieurs et posturaux [81]. Suite à une période de vol comprise entre 112 et 196 jours à bord de la station Mir, les membres de l'équipage ont présenté une réduction du volume des muscles gastrocnémien et soléaire (de l'ordre de 19%) et du quadriceps (10%). Suite à 7 jours d'alitement, le volume musculaire au niveau de la cuisse est réduit de 3%. D'autres études d'alitement ont montré une perte de volume entre 6 et 11% après 20 jours d'alitement [82] [83], autour de 5-11% après 30 jours d'alitement [84, 85] ou encore une perte de volume de 14-17% après 42 jours d'alitement [86]. Au-delà de la perte de volume, les conséquences de la microgravité au niveau musculo-squelettique s'accompagnent de pertes de fonctions musculaires. De ce fait, l'atrophie musculaire est associée à une perte d'endurance, de force et donc à une perte de puissance musculaire [87]. Des données neuromusculaires enregistrées par électromyographie (EMG) ont montré une réduction de l'ordre de 35-40% de l'activité des fléchisseurs plantaires après un séjour compris entre 90 et 180 jours dans l'espace [88]. Toutefois, des études contradictoires ont mis en évidence une augmentation de l'activité EMG au sein des muscles tibial antérieur et soléaire, sans constater de changement au sein du muscle gastrocnémien [89]. Des études d'alitement ont rapporté une perte de performance des muscles extenseurs des genoux. Après 14 jours d'alitement, la force des muscles extenseurs des genoux a baissé de 15%. Après 35 jours la force des muscles gastrocnémien et soléaire a baissé de 25% [90, 91]. L'atrophie musculaire que subissent les organismes soumis à la microgravité serait due à une réduction de la taille des fibres musculaires et de la synthèse de protéines contractiles plutôt qu'à une perte de fibres musculaires. Ferrando et al. ont mis en évidence un bilan azoté négatif et une réduction de 50% de la synthèse protéique au sein des muscles squelettiques [92]. La réaction des noyaux de fibres musculaires a été analysée au sein de différentes fibres musculaires en réponse à 16 jours de suspension sur des rats Wistar. Suite à la suspension, le nombre moyen de noyaux et de cellules satellites mitotiques/quiescentes dans une seule fibre au sein du muscle soléaire a diminué de 49 et 70/63% comparé aux niveaux de base. Ces résultats

indiquent que la suspension inhibe la synthèse protéique au sein des muscles antigravitaires [93]. De plus, suite à un alitement prolongé de 5 semaines à  $-6^\circ$ , une réduction de la synthèse protéique a été objectivée sans aucun effet de l'alitement sur le catabolisme protéique [94]. La perte de volume ainsi que la perte de force peuvent s'expliquer par le type de fibres présentes au sein de chaque muscle. Les muscles sont constitués de fibres musculaires, elles-mêmes organisées en myofibrilles qui contiennent les unités motrices musculaires, à savoir les sarcomères. Ces sarcomères sont composés entre autres de filaments fins d'actine et de filaments épais de myosine qui permettent la contraction musculaire. Plusieurs isoformes de myosine existent et permettent de distinguer les fibres musculaires entre elles. On distingue des fibres musculaires rouges, lentes, capillarisées qui entraînent des contractions lentes, qui sont peu fatigables mais qui développent peu de force et qui expriment des isoformes de myosine de type lent. Ce sont les fibres de type I oxydatives. D'autres fibres musculaires, blanches, rapides, non capillarisées entraînent des contractions rapides avec beaucoup de force mais sont rapidement fatigables. Ce sont les fibres de type II glycolytiques qui expriment des isoformes de myosine de type rapide. Les fibres de type II se subdivisent en fibres IIa et IIb, les fibres IIa étant des fibres intermédiaires, plus résistantes à la fatigue musculaire, tandis que les fibres de type IIb sont les fibres musculaires les plus rapides et les plus fatigables.

De nombreuses données ont été accumulées sur l'évolution des fibres musculaires au cours des différentes missions spatiales, lors des différentes études de microgravité simulée ou sur les modèles animaux. Des données obtenues suite à un vol spatial de 11 jours ont mis en évidence une atteinte de la section transversale au sein des fibres du muscle vaste latéral, avec une atteinte plus conséquente des fibres de type IIb par rapport aux fibres de type I, soit une atteinte préférentielle des fibres musculaires rapides glycolytiques en comparaison de l'atteinte des fibres lentes oxydatives [94, 95]. Les adaptations musculaires causées par les vols spatiaux, ou par les modèles d'études de microgravité simulée induisent des changements phénotypiques des fibres musculaires lentes résistantes à la fatigue vers des fibres musculaires rapides plus facilement fatigables [81]. Ainsi, suite à une réduction de l'utilisation musculaire secondaire à la microgravité, un remodelage musculaire a été constaté chez les astronautes, lors d'études d'alitement mais aussi de suspension de modèles animaux. Les conditions microgravitaires implique non seulement une transition des chaînes de myosine lentes vers des chaînes de myosine rapides mais également des changements métaboliques dans l'utilisation des substrats énergétiques au sein des muscles [96] [87]. Les fibres musculaires rapides dépendent en priorité des stocks énergétiques musculaires de glucides présents sous forme de glycogène. La glycolyse s'avère très efficace pour fournir l'énergie au cours d'activités courtes de haute intensité mais si un effort soutenu est nécessaire, un profil énergétique favorable à l'utilisation des lipides est préférable. Or, lors des vols spatiaux les astronautes réalisent des activités extravéhiculaires au cours desquelles ils doivent fournir et maintenir un effort conséquent pendant plusieurs heures. Dans ces conditions, l'augmentation de la fatigue musculaire est contreproductive voire dangereuse pour les astronautes et la mission ; raisons pour lesquelles il est primordial de maintenir les capacités musculaires aussi fonctionnelles que possible au cours des missions spatiales [96] et pour cela, limiter la transition des fibres musculaires oxydatives vers des fibres rapides. Pour autant, la microgravité (réelle et simulée) induit une réduction de la capacité musculaire à oxyder les lipides et une augmentation de l'utilisation de substrats énergétiques provenant de la glycolyse à la fois chez l'Homme et le rat [81]. Ainsi des études ont démontré une plus grande dépendance énergétique pour le glucose au sein des muscles atrophiés du fait de l'augmentation de l'expression d'enzymes glycolytiques après un vol spatial [97, 98]. Plus encore, au cours d'études d'alitement, Ferreti et al. Et Hikida et al. ont montré une réduction

de l'expression d'une enzyme clé de l'oxydation des acides gras, à savoir la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase au sein du muscle *vastus lateralis* [99, 100].

Par ailleurs, la microgravité pourrait également avoir pour effet de diminuer le flux sanguin arrivant aux muscles lors d'un exercice physique. Cette action aurait pour effet d'augmenter les taux d'hydrolyse de créatine phosphate et d'ATP au sein des muscles et d'augmenter la production d'ADP, d'AMP et de phosphates inorganiques et induirait également la stimulation de la glycolyse [87]. La sollicitation accrue de la glycolyse aurait pour effet d'augmenter les taux de production d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA, ce dernier étant connu pour inhiber la carnitine palmytoyltransférase (CPT1), à savoir l'enzyme responsable de l'oxydation des longues chaînes d'acide gras, ce qui entraînerait une réduction plus conséquente de l'oxydation des acides gras (Figure 9). Plus encore, les modèles de microgravité simulée ainsi que les vols spatiaux induisent une réduction de l'activité de l'AMPK, enzyme clé impliquée dans le contrôle de nombreuses voies métaboliques. Par exemple, une réduction de l'activité de l'AMPK pourrait réduire l'inactivation de l'acétyl-CoA carboxylase, entraînant une surproduction de malonyl-CoA et limiter encore plus l'oxydation des acides gras [87]. Par ailleurs, au repos ou après un exercice physique, la microgravité réduirait la libération des acides gras du tissu adipeux. Cette réduction de mobilisation empêcherait un apport d'acides gras au sein du tissu musculaire et atténuerait donc l'oxydation des acides gras.

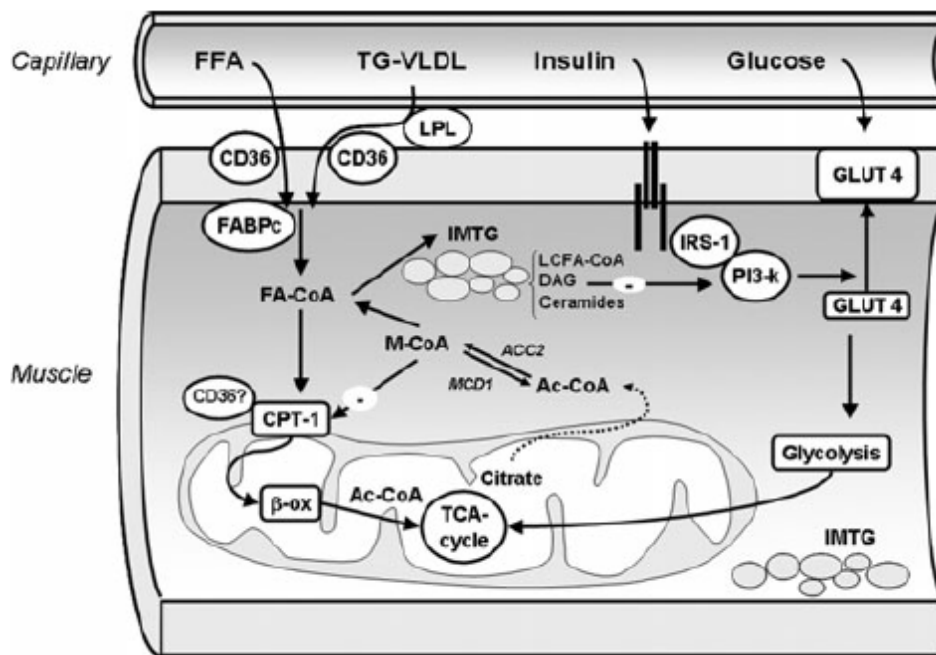


Figure 9 : Représentation du métabolisme cellulaire au sein d'un myocyte pour illustrer l'impact de la microgravité. Sous l'effet d'une stimulation de l'insuline par la prise d'un repas, le glucose et les acides gras entrent dans le myocyte par l'intermédiaire du récepteur GLUT4 et CD36 respectivement. Les nutriments sont utilisés au sein de la mitochondrie pour fournir l'énergie nécessaire aux fonctions du muscle, ce qui entraîne une production et une libération de citrate au niveau du cytosol, ce qui aboutit à une augmentation de la production de malonyl-CoA (M-CoA). Le malonyl-CoA est un inhibiteur de la carnitine palmytoyltransférase (CPT1), l'enzyme responsable de l'oxydation des longues chaînes d'acide gras. Cette inhibition a pour conséquence de limiter l'entrée d'acyl-coA au sein de la mitochondrie et ainsi limiter la  $\beta$ -oxydation. Ce décalage entre l'oxydation et l'absorption entraîne un stockage de lipides au sein des muscles représentés par les IMTG ainsi qu'une augmentation de la production d'intermédiaires lipidiques à potentiel lipotoxique tels que les diacylglycérols (DAG) ou encore les céramides. Adapté de Corpeleijn et al. (2008).

De la perturbation de l'oxydation des substrats énergétiques est associée une accumulation de ces substrats énergétiques au sein des muscles atrophiés. En particulier, une accumulation de triglycérides a été mise en évidence au cours d'études de modèles animaux suspendus [101], d'alitement prolongé [102], ainsi que de vols spatiaux [103]. Dans certaines études, ces dépôts lipidiques au sein des muscles ont été liés à des événements lipotoxiques incluant le développement d'une résistance à l'insuline [104, 105]. Toutefois, une récente étude publiée par Dirks et al. a démontré qu'une semaine d'alitement prolongé conduisait à une atrophie musculaire, une résistance à l'insuline et une atteinte des capacités oxydatives musculaires sans pour autant être médié par des mécanismes d'accumulation lipidique au sein des muscles, de stress oxydant ou de perturbation micro- ou macro vasculaire [106]. Ainsi, bien que l'accumulation de différents intermédiaires lipidiques ait été liée au développement d'une insulino-résistance [104, 105], les résultats ne sont pas unanimes et semblent indiquer l'implication d'autres processus pour aboutir au développement d'une résistance à l'insuline.

Des données suggèrent également que la transition musculaire des fibres lentes vers les fibres rapides pourrait être favorisée par une modification de la disponibilité des substrats énergétiques, en lien notamment à des changements du métabolisme hépatique. Au cours d'une étude de suspension animale, une augmentation de l'activité des enzymes glycolytiques au sein de muscles atrophiés était associée à une augmentation de la disponibilité du glucose d'origine hépatique. Les résultats sur le modèle animal suggèrent alors que l'augmentation de l'utilisation du glucose au niveau musculaire pourrait ainsi être induite par une augmentation de la disponibilité du glucose au niveau hépatique par la stimulation du mécanisme de néoglucogenèse [96].

Il apparaît évident qu'un lien existe entre les adaptations qui se mettent en place au niveau du système musculo-squelettique et le métabolisme. Il convient donc de s'intéresser aux adaptations énergétiques et métaboliques engendrées par la microgravité.

### 3. Balance énergétique et atteintes métaboliques secondaires à l'exposition à la microgravité

#### a. Régulation de la balance énergétique

En situation physiologique, la régulation du poids corporel et de la composition corporelle implique deux conditions essentielles. En premier lieu, la notion de balance énergétique doit être appliquée dans le sens où l'apport énergétique doit être équivalent aux dépenses énergétiques d'un individu donné (Figure 10). Chez l'Homme les dépenses énergétiques sont d'amplitudes variables mais continues. Cela suppose une disponibilité ininterrompue de l'énergie assurée en période inter-prandiale par un compartiment de réserve énergétique, lui-même entretenu par des apports réguliers, rythmés par les repas. L'état de balance énergétique montre des variations au jour le jour mais paraît maintenu sur des périodes allant de plusieurs semaines à plusieurs mois sur des individus ayant un poids stable. Dans un deuxième temps, le maintien du poids et de la composition corporelle est permis si une balance est respectée pour chacun des substrats énergétiques, à savoir les glucides, les lipides et les protéines. Ainsi, l'oxydation des carbohydrates, des lipides et des protéines doit être égale à l'apport individuel de chacun de ces substrats. [107]. Dans les cas où ces conditions ne sont pas respectées, la composition corporelle et à terme le poids des individus s'en trouvent altérés. Plusieurs situations peuvent alors être rencontrées.

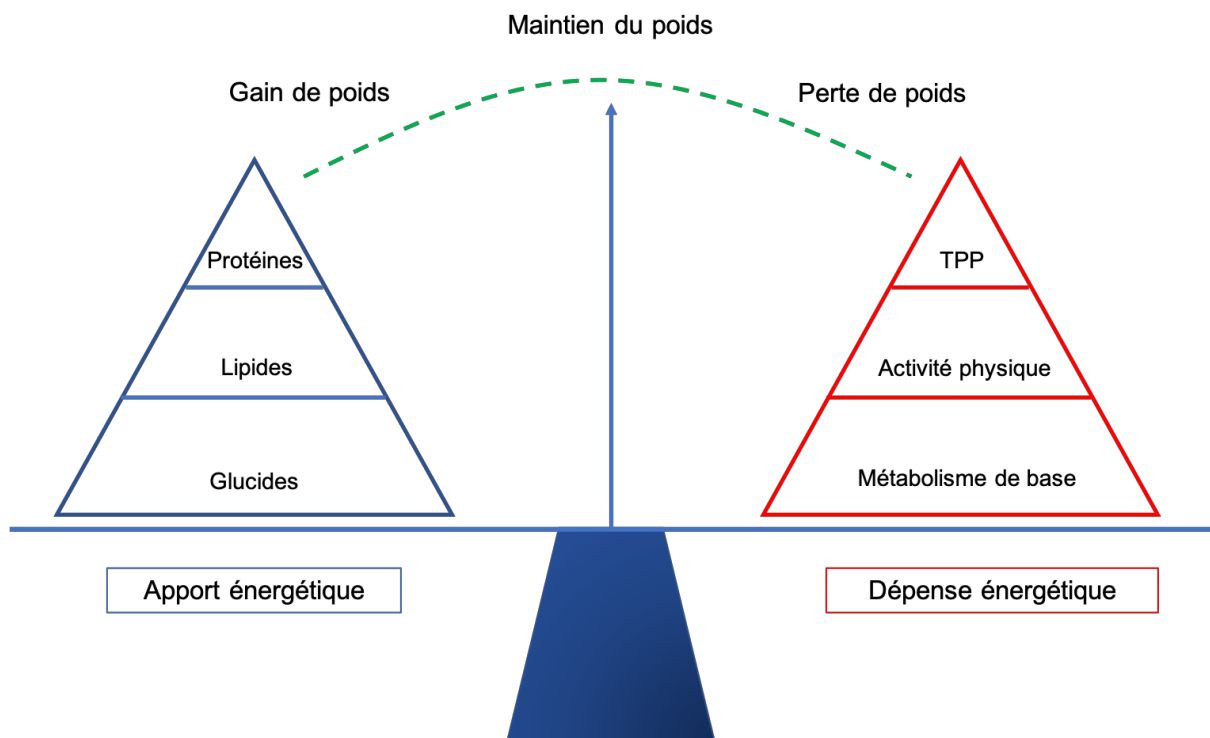


Figure 10 : Régulation de la balance énergétique entre les éléments qui composent les apports et les dépenses énergétiques.

Si l'apport énergétique est supérieur à la dépense énergétique d'un individu, l'excès d'énergie ingéré est stocké au sein de l'organisme. Lorsque les apports énergétiques sont supérieurs aux dépenses, une hiérarchie est constatée entre les différents types de substrats énergétiques. L'alcool est au sommet de cette hiérarchie oxydative dans la mesure où il n'y a aucun compartiment de stockage, pour être rapidement éliminé compte tenu de sa toxicité. L'ingestion d'alcool stimule immédiatement son oxydation qui, en retour, diminue voire supprime l'oxydation des autres macronutriments surtout en situation de repos où la demande énergétique totale n'est pas majorée. Ceci aboutit à l'élimination de l'alcool par voie oxydative dans les 6 heures qui suivent son ingestion. Les glucides occupent la seconde place dans la hiérarchie. En effet le compartiment de réserves glucidiques (sous forme de glycogène) est limité (300 g à 600 g au total) répartis entre le foie et les muscles. Dans la hiérarchisation de l'oxydation des substrats, les protéines sont proches des glucides dans la mesure où les capacités de stockage à court terme sous forme d'acides aminés ou de protéines sont également très limitées. De cette manière, tout excès d'apport en protéines mène rapidement à une augmentation de l'oxydation des protéines ingérées, ce qui permet un retour à un état de balance protéique. Les lipides occupent la dernière place dans la hiérarchie oxydative et se distinguent des autres macronutriments par un compartiment de réserve immense et une quasi absence d'autorégulation entre l'ingestion de lipides et l'oxydation lipidique. Ainsi, tout excès d'apport lipidique mène à un stockage au sein de l'organisme, particulièrement au sein du tissu adipeux.

Dans le cas où la dépense énergétique est supérieure aux apports, l'organisme puise son énergie à partir des stocks lipidiques situées au sein du tissu adipeux, aboutissant à une balance lipidique négative. La dépense énergétique totale d'un individu dépend de trois composantes. Premièrement, elle est fonction

du métabolisme de base qui correspond à la dépense énergétique allouée aux fonctions de base de l'organisme. Deuxièmement, elle dépend de la thermogénèse postprandiale (TPP), qui correspond à la dépense énergétique dédiée à la digestion, l'assimilation et l'utilisation des nutriments. Enfin, la dépense énergétique totale est soumise aux variations de la dépense énergétique liée à l'activité physique [108]. Cela concerne aussi bien les activités de la vie quotidienne que les exercices physiques plus intenses, qu'ils soient sportifs ou non. En effet, au cours d'un mouvement, le travail mécanique exercé requiert de l'énergie. La perte d'énergie est due à la fois à la chaleur produite lors de la synthèse d'ATP au sein des mitochondries et à l'hydrolyse de l'ATP au cours des contractions musculaires. Au sein d'individus de même poids, la pratique d'activité physique induit une augmentation du métabolisme de base [109]. Ces changements peuvent être attribués aux changements de composition corporelle du fait que des individus sportifs présentent plus de masse maigre métaboliquement active et moins de masse grasse. Au contraire de la thermogénèse postprandiale qui ne représente que 10% de la dépense énergétique, l'activité physique apparaît comme un composant majeur de la dépense énergétique totale et donc de la balance énergétique.

b. Données issues des vols spatiaux et des études de microgravité simulée

Compte tenu de l'importance de la régulation du métabolisme des substrats et du maintien de la balance énergétique, les agences spatiales se sont intéressées très tôt à l'impact des vols spatiaux sur la dépense énergétique et l'oxydation des substrats énergétiques. Au cours des vols spatiaux, les besoins énergétiques sont les mêmes que sur Terre. Pourtant, les astronautes consomment moins de nourriture que nécessaire pour couvrir leurs besoins énergétiques [108]. Bien que les déficits énergétiques soient facilement tolérables au cours de missions spatiales de courte durée grâce à la disponibilité énergétique que représente les stocks graisseux, une balance énergétique négative chronique deviendrait problématique et affecterait la santé et la performance des astronautes en mission (Figure 11) [108].

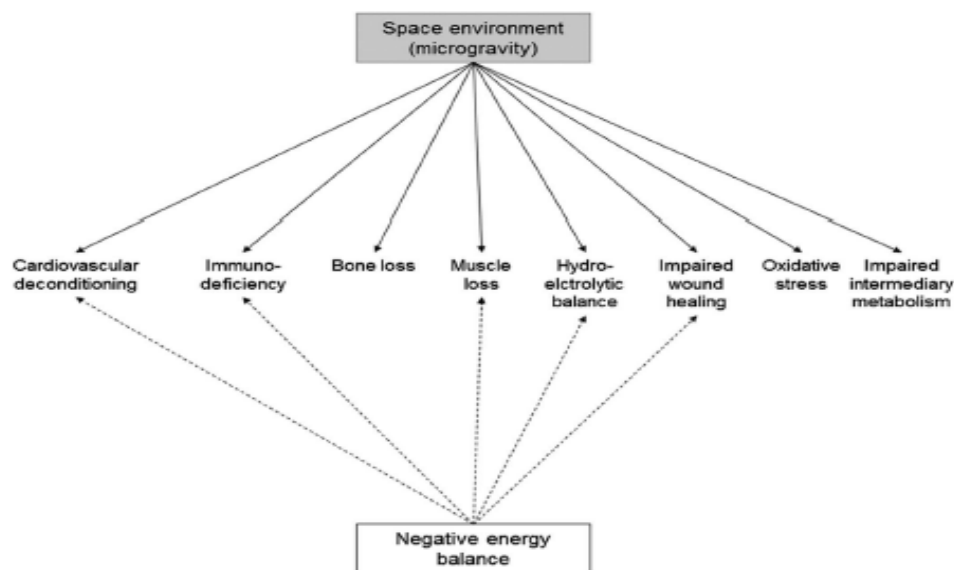


Figure 11 : Adaptations engendrées par une balance énergétique négative au cours d'une exposition à la microgravité. Adapté de Bergouignan et al. (2016).



Plusieurs études se sont intéressées à la balance énergétique en situation de microgravité. Au cours d'une mission spatiale de 1996, le suivi de l'apport nutritionnel et l'utilisation d'eau doublement marquée ( $^2\text{H}_2^{18}\text{O}$ ) pour quantifier la dépense énergétique a permis de mesurer la balance énergétique des astronautes au cours du vol. Ces derniers se trouvaient en balance énergétique négative (-14kcal/kg/j) dû à un apport calorique trop faible (24,6 kcal/kg/j) [110]. Les tests réalisés sur les astronautes à leur retour sur Terre ont pourtant montré une augmentation des dépôts de graisse après analyse histologique des biopsies musculaires. Une autre mission à plus long terme à bord de la station spatiale russe, MIR, a également induit une balance énergétique négative des suites de laquelle les astronautes russes avaient perdu du poids, de la masse grasse et dont les muscles étaient atrophiés. Bien que la compréhension des raisons pour lesquelles les astronautes se retrouvent en balance énergétique négative au cours des missions spatiales nécessite de nouvelles études, il est tout de même admis que l'origine de cette balance énergétique négative est due à un apport énergétique trop faible et/ou à une dépense énergétique trop élevée. De précédentes études ont pu confirmer que les astronautes ingéraient 25 à 30% moins de nourriture que nécessaire pour parvenir à maintenir un poids stable [110, 111]. Par ailleurs, l'exercice physique pratiqué à bord pour prévenir les pertes musculaires, osseuses et cardiovasculaires entretient la balance énergétique négative en augmentant la dépense énergétique totale. À titre d'exemple, en moyenne, les besoins énergétiques dans l'espace sont d'environ 7,5 MJ/jour et 8,5 MJ/jour respectivement pour une femme de 55kg et un homme de 70kg. L'énergie dépensée par les astronautes au cours de la pratique de leur programme d'activité physique doit également être pris en compte pour l'évaluation des besoins énergétiques. Pour autant, il est extrêmement difficile d'évaluer le coût énergétique de l'entraînement physique des astronautes, ce qui contribue au déficit énergétique constaté en vol. Au-delà des dépenses énergétiques habituelles rencontrées sur Terre, les astronautes réalisent également des sorties extravéhiculaires qui se révèlent gourmandes en énergie. Ce type d'activité physique à un coût énergétique relatif d'environ 10,5 et 10,9 kJ/kg/h respectivement pour une femme et un homme. Ainsi, dans l'estimation des besoins énergétiques, la prise en compte de la dépense occasionnée par les sorties extravéhiculaires occasionne une augmentation de 2,2 et 2,9 MJ/j pour une femme et un homme respectivement. Au total, les besoins énergétiques des astronautes s'élèveraient à 9,7 MJ/j pour une femme et 11,4 MJ/j pour un homme. En prenant en compte ces nouvelles données, de nouvelles études ont été conduites récemment afin d'évaluer les différents composants de la dépense énergétique et mieux estimer les besoins énergétiques des astronautes en mission à bord de l'ISS [108].

Les études de microgravité simulée ont aussi permis d'évaluer les conséquences des variations de balance énergétique. Lors d'une étude d'alitement de 5 semaines, Biolo et al. ont étudié l'impact de 5 semaines d'alitement sur 19 participants en situation de balance énergétique positive. Les résultats ont démontré une perte de poids, une augmentation de la masse grasse ainsi qu'une atrophie musculaire et une diminution de l'épaisseur du muscle vaste latéral du quadriceps. Ces adaptations étaient associées à une activation de l'inflammation et des défenses anti-oxydantes. Lorsque la balance énergétique était positive mais de façon moindre, les différentes adaptations induites par l'alitement étaient toujours présentes mais atténuées [112]. D'autres études ont également constaté une augmentation de la masse grasse en parallèle du catabolisme de la masse maigre lorsque l'apport nutritionnel n'était pas contrôlé en situation d'inactivité physique (alitement). Plus encore, au cours d'une étude d'alitement prolongé de 42 jours au cours de laquelle les volontaires étaient à l'équilibre énergétique, Blanc et al. ont montré une perte de poids des volontaires, accompagné d'une réduction de la dépense énergétique totale due

à l'inactivité physique, une perte de masse maigre au sein des membres inactifs (les jambes et le tronc) tandis que la masse grasse était maintenue au cours de l'alitement. Ainsi, le maintien de la balance énergétique ne permettait pas d'expliquer la perte de poids des volontaires ce qui a permis de révéler l'action d'un stress métabolique [113]. En situation de balance énergétique, une autre étude d'alitement prolongé de 42 jours a induit une réduction de l'oxydation des lipides au profit de l'oxydation des glucides tout en entraînant une perte de masse maigre et une augmentation de la masse grasse [102].

### c. Corrélats entre microgravité et sédentarité

Dans nos sociétés occidentales, l'inactivité physique (absence d'activité physique ou niveau d'activité physique en-dessous des recommandations actuelles) [114], la généralisation d'un comportement sédentaire (absence de mouvements et station assise prolongée) et des habitudes alimentaires dirigés vers des repas trop gras, trop sucrés, entre autres, sont, pour beaucoup, les nouvelles références de vie. Cette évolution est pourtant en décalage avec l'histoire de notre évolution et la pratique d'activité physique au sein des populations est bien en-deçà des recommandations émises par les différents organismes de santé. Cet état des lieux est encore plus alarmant lorsque l'on sait que la sédentarité et l'inactivité physique ont des conséquences délétères sur notre santé, et contribuent à expliquer l'augmentation du nombre de diabétiques dans le monde. De nombreuses études suggèrent que l'inactivité physique est une des causes du développement de maladies métaboliques chroniques comme l'obésité, la résistance à l'insuline, le diabète de type II ou encore l'hypertension. À titre de comparaison, le taux de mortalité dû à l'inactivité physique s'élève à plus de 5 millions de personnes en 2017, faisant de l'inactivité physique, la quatrième cause de mortalité dans le monde. Les chiffres parus récemment prévoient encore une hausse pour les années à venir.

Au cours des vols spatiaux, les adaptations physiologiques en vol impliquent des adaptations métaboliques qui sont au moins partiellement associées à l'inactivité physique. Comme nous l'avons vu, les adaptations métaboliques rencontrées en vol sont bien reproduites au cours des études de microgravité simulée, plus particulièrement lors des études d'alitement prolongé. Ces études représentent ainsi un moyen unique d'étudier les mécanismes par lesquels l'inactivité physique mène au développement des maladies chroniques actuelles de la société [115]. Le niveau d'activité physique rencontré au cours des études d'alitement prolongé avoisine le niveau d'activité physique (PAL) d'individus peu actifs et sédentaires (PAL ~ 1,4 – 1,5), notamment du fait des petits mouvements réalisés lors de l'alitement. De ce fait, l'étude d'une population d'individus sédentaires et inactifs permet également de suivre les adaptations métaboliques et fonctionnelles engendrées par l'inactivité physique. Des études se sont d'ailleurs intéressées aux effets d'un jour de sédentarité sur l'action de l'insuline. Bien que l'insulino-résistance soit connu comme un des premiers marqueurs dans le développement du diabète de type II, Stephens et al. ont contribué à démontrer l'impact de l'inactivité physique dans l'étiologie de la résistance à l'insuline [116]. L'insulino-résistance est d'ailleurs considérée comme le lien unique le plus probable parmi de nombreux facteurs de risque cardiométaboliques connus sous le nom de syndrome métabolique liant l'obésité, le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires [117, 118].

L'inflexibilité métabolique est également une caractéristique métabolique observée chez les personnes atteintes de maladies métaboliques chroniques telles que l'obésité [119, 120], l'insulino-résistance [121, 122], et le diabète de type II [123-125].

#### d. Les différentes atteintes métaboliques

##### i. Résistance à l'insuline

De nombreuses études d'alitement de durées différentes ont montré une réduction de la sensibilité à l'insuline au cours de l'alitement [126-134]. En particulier, les études ont été menées afin de comprendre les mécanismes qui induisaient une réduction de la réponse à l'insuline au sein des organes les plus sensibles à cette hormone, à savoir, les muscles, le tissu adipeux et le foie. Lors d'une étude d'alitement de 7 jours, Mikines et al. ont ainsi montré une réduction de l'action de l'insuline au niveau musculaire avec une baisse de l'absorption musculaire du glucose et une réduction du stockage sous forme de glycogène [135, 136]. Tabata et al. ont quant à eux démontré une réduction de 16% dans l'expression du transporteur musculaire du glucose (GLUT4) lors d'une étude d'alitement de 20 jours, témoignant du développement d'une résistance à l'insuline au niveau musculaire [137]. Grâce à l'utilisation d'isotopes stables pour suivre le métabolisme du glucose (endogène et exogène), Blanc et al. ont mis en évidence le développement d'une résistance à l'insuline au niveau musculaire chez les hommes et le développement d'une insulino-résistance au niveau musculaire et hépatique chez les femmes au cours d'une étude d'alitement de 7 jours [138]. Cette étude a ainsi mis en évidence un effet lié au sexe concernant la sensibilité à l'insuline au cours d'un alitement prolongé et a mis en évidence une insulino-résistance hépatique, au moins chez les femmes.

De même après alitement, les volontaires de cette étude montraient une réduction du taux d'acides gras plasmatiques à jeun et une augmentation du taux d'insuline. En revanche, l'inactivité physique causée par 7 jours d'alitement n'a pas réduit la sensibilité à l'insuline au sein du tissu adipeux. D'autres études d'alitement ont associé la résistance à l'insuline à une réduction de la lipolyse chez l'homme. Cependant, certaines études menées par le passé ne prenaient pas en considération le contrôle du régime alimentaire des volontaires au cours des études, ce qui peut avoir masqué les réels effets causés par l'alitement. Par exemple, en cas de balance énergétique positive, les effets de l'inactivité physique causés par l'alitement peuvent être exagérés. D'autres études ont en revanche contrôlé le régime alimentaire des volontaires au cours de l'alitement. Dans ces conditions, Bergouignan et al. ont ainsi démontré que l'inactivité physique menait au développement d'une résistance à l'insuline après un repas (situation postprandiale) ou à distance du dernier repas (condition postabsorptive) [139, 140].

Des publications ont également étudié l'impact de l'alitement / l'inactivité physique en fonction d'une éventuelle susceptibilité génétique individuelle en comparant l'impact d'un alitement de 9-10 jours entre des individus sains, des individus nés d'un parent diabétique et des individus non diabétiques mais à risque. Sonne et al. ont ainsi noté une réduction de la sensibilité à l'insuline au niveau musculaire et plasmatique au sein du groupe d'individus sains et à risque. Une réduction de la sensibilité à l'insuline au niveau hépatique a également été démontrée mais uniquement au sein du groupe qui montrait des prédispositions au diabète [141].

L'ensemble de ces études d'alitement confirment que la microgravité simulée (l'inactivité physique) engendre une réduction de la sensibilité à l'insuline associée au développement d'une résistance à l'insuline au niveau musculaire et plasmatique, prédisposant au diabète de type II. Au-delà de la microgravité, le diabète de type II dépend également de prédispositions génétiques. Des publications récentes ont ainsi mis en évidence six régions impliqués dans l'étiologie du diabète de type II. Au total, 11 régions génomiques ont pu être identifiées pour altérer le risque de diabète de type II. Parmi ces régions, le gène associé à la masse grasse et à l'obésité, appelé FTO, prédispose au diabète de type II

en altérant l'indice de masse corporelle (IMC) [142]. Ces résultats ont également été mis en évidence à travers une autre étude qui a décrit une association entre le gène FTO, l'IMC et le risque d'obésité au sein de la population [143].

D'un point de vue mécanistique, le transport du glucose est régi par la voie métabolique de l'insuline et implique différentes protéines. Tout d'abord, l'insuline se fixe et active la sous-unité  $\beta$  de son récepteur ce qui entraîne la phosphorylation d'IRS-1. Ce dernier interagit ensuite avec la sous unité p85 de la kinase PI3K. La molécule PI3K active une kinase qui permet de réguler la kinase Akt et permet la translocation du récepteur GLUT-4 au niveau de la membrane pour faciliter le transport du glucose par diffusion [115].

Les études d'alitement et les modèles d'études animaux ont permis de mettre en évidence les voies métaboliques impliquées dans la résistance à l'insuline. O'keefe et al. ont montré par l'intermédiaire d'un modèle de rats suspendus, une réduction de la tolérance au glucose et de l'absorption du glucose musculaire suite à un jour de suspension. Le développement de cette résistance à l'insuline était dû à des changements de phosphorylation de la molécule p38-MAPK [144]. Après 3 à 7 jours de suspension, une insulino-résistance a également été observée mais celle-ci était associée à une augmentation de la voie métabolique de l'insuline via la stimulation de IRS-1 et PI3K ainsi qu'une diminution de l'expression de la voie P38-MAPK. Ces données suggèrent que d'autres mécanismes pourraient réguler l'adaptation à la suspension.

Des études d'alitement prolongé ont également permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de la résistance à l'insuline en utilisant des puces à ADN. Dans ces études l'alitement a induit une sous-régulation de 34 voies métaboliques, pour la plupart impliquées dans les fonctions mitochondriales tels que PGC1 $\alpha$ , OXPHOS responsable de la phosphorylation oxydative, suggérant une réduction des capacités oxydatives. De même, les puces à ADN ont permis de montrer la sous-expression de gènes comme VEGFA et hexokinase 2 et une surexpression de RRAD, ces deux derniers étant la source d'altérations transcriptionnelles les plus marquées au sein de muscles squelettiques de patients diabétiques, contribuant aux perturbations du transport du glucose et de la réponse à l'insuline. Ainsi, les altérations remarquées dans l'expression des gènes hexokinase 2 et RRAD suite à l'alitement prolongé démontrent que l'inactivité physique entraîne des altérations communes à celles présentes au sein de patients atteints de diabète de type II. Par ailleurs, Alibegovic et al. ont observé une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation et le stress du réticulum endoplasmique en réponse à la stimulation à l'insuline au cours de l'alitement [145]. D'autres auteurs ont également montré une surexpression de marqueurs pro-inflammatoires [112, 132] et du stress oxydant [146]. Or, l'inflammation et le stress oxydant sont des facteurs qui ont un impact négatif sur la sensibilité à l'insuline et sont autant de voies métaboliques à étudier en lien avec le développement d'insulino-résistance.

## ii. Développement d'une hypertriglycéridémie

La résistance à l'insuline développée au cours des études d'alitement s'accompagne du développement d'une hypertriglycéridémie [115, 138-140], tant à jeun qu'en situation postprandiale [130]. En théorie ce phénomène peut s'expliquer de 3 façons : une augmentation de la lipolyse au sein du tissu adipeux, une réduction de la clairance des acides gras plasmatiques ou une combinaison des deux situations précédentes. Or, plusieurs études antérieures ont montré que l'alitement prolongé induisait plutôt une réduction de la lipolyse [147]. Une autre étude menée par Hojberre et al. ont étudié l'évolution de l'absorption du glucose et de la lipolyse dans le tissu adipeux abdominal et fémoral à partir de microdialyses réalisées sur un groupe d'individus sains et un groupe composé de descendants de patients atteints de diabète de type II. Après 10 jours d'alitement, une réduction de la lipolyse et une augmentation de l'absorption du glucose ont été constatées au niveau du tissu adipeux fémoral dans les deux groupes, tandis que l'absorption du glucose au sein du tissu adipeux abdominal n'a augmenté qu'au sein du groupe contrôle (individus sains). Sur la base de ces résultats les auteurs ont conclu que l'inactivité physique était préjudiciable aux deux groupes et qu'elle tendait à atténuer la différence de captation du glucose qui était présente à la base entre les deux groupes [148]. Ainsi, l'hypertriglycéridémie induite par l'alitement ne semble pas être due à une augmentation de la lipolyse mais bien à une réduction de l'absorption des acides gras plasmatiques.

Bergouignan et al. ont également étudié l'absorption de lipides au sein des tissus périphériques en suivant les voies métaboliques des acides gras plasmatiques issus de l'alimentation via l'utilisation de traceurs isotopiques. Après deux mois d'alitement, le taux de relargage des NEFA après hydrolyse des lipoprotéines (chylomicrons et VLDL) était augmenté [115]. L'augmentation des NEFA plasmatiques suggère que les NEFA ne sont plus captés de la même manière par les tissus périphériques, ce qui serait en partie expliqué par une diminution de l'expression des gènes LPL et FAT/CD36 qui codent pour la lipoprotéine lipase et du récepteur CD36 qui permet l'internalisation d'acides gras dans les cellules.

Des études de suspension sur le modèle animal ont montré que 11 heures à 11 jours d'inactivité entraînait une réduction de 80% de l'activité de la molécule LPL au sein des muscles, témoignant encore d'une réduction de l'absorption des lipides par les muscles en situation d'inactivité [149-151]. D'autres ont suivi l'évolution du métabolisme lipidique au cours d'un protocole d'activité physique de 21 jours suivi d'une période d'arrêt d'activité. Après 53 heures d'arrêt d'activité, les auteurs ont constaté une augmentation de 25 à 48% du poids de la graisse épидidymaire et omentale. De même l'incorporation de palmitate au sein des triglycérides était augmentée conjointement à l'augmentation d'expression de la molécule mGPAT, molécule régulatrice de la synthèse des triglycérides [150, 151]. L'ensemble des données collectées à partir des études d'alitement prolongé et de modèles animaux, démontrent donc que l'inactivité physique induit un détournement du devenir des acides gras, qui, au lieu d'être dirigés vers les muscles, sont stockés au niveau du tissu adipeux.

### iii. Réduction de l'oxydation des lipides et stockage ectopique musculaire

L'oxydation des substrats énergétiques en condition physiologique dépend du type et de la quantité des substrats disponibles au niveau cellulaire. Afin de déterminer à partir de quelle source énergétique, un individu puise son énergie, le quotient respiratoire (QR) ou quotient respiratoire non protéique (QRNP) est utilisé. Lors d'études d'alitement, des changements d'utilisation des ressources énergétiques ont été constatés avec une oxydation majoritaire de glucides au détriment de l'oxydation des lipides à jeun indépendamment de la balance énergétique. De même, des études témoignent d'une incapacité des sujets à utiliser les glucides suite à l'ingestion d'un repas [115]. Au-delà, les résultats démontrent également une atrophie musculaire et induisent donc des changements de masse métaboliquement active, à savoir la masse maigre, qui impacte également l'oxydation des substrats énergétiques.

Les études montrent des variations de la valeur du QRNP de l'ordre de 4 à 14% en fonction de la durée de l'alitement [139, 140, 152]. Trois mois d'alitement ont induit une réduction de 37% de l'oxydation lipidique et une augmentation de 21% de l'oxydation des glucides en situation postabsorptive. En revanche, en situation postprandiale, l'alitement induit une réduction de 40% de l'oxydation lipidique et l'augmentation de l'oxydation glucidique de 6% [139]. Plus particulièrement, il est établi que l'oxydation des substrats énergétiques ne dépend pas seulement du type de substrats énergétiques mais également de la classe de nutriments dans chaque catégorie de substrats énergétiques. Par exemple, l'oxydation lipidique dépend de la longueur de la chaîne d'acide gras et du taux de saturation/insaturation des acides gras consommés par un individu. Ainsi, la consommation d'acides gras à chaîne courte et/ou d'acides gras disposant d'un grand nombre d'insaturation permettent une meilleure oxydation lipidique [153]. Grâce à l'utilisation d'acides gras marqués avec des isotopes stables, il a été mis en évidence que l'inactivité physique induit une oxydation différente selon qu'il s'agit d'acides gras saturés ou insaturés. Bergouignan et al. ont montré que l'inactivité physique secondaire à un alitement prolongé induisait une réduction de l'oxydation des acides gras saturés (en l'occurrence du palmitate). Ces derniers se retrouvaient alors incorporés au sein des lipides intramusculaires [140]. Au niveau moléculaire les raisons de ce devenir métabolique peuvent être expliquées en partie par des modulations de l'activité de la carnityl palmiotyl-transférase (CPT-1) et de mtGPAT qui régulent respectivement l'entrée d'acides gras dans la mitochondrie, ainsi que l'oxydation lipidique et la synthèse de triglycérides (Figure 9). Ces deux molécules sont situées sur la membrane externe mitochondriale ce qui permet une régulation fine entre dégradation et synthèse d'acides gras au niveau hépatique et musculaire. Leur action est soumise au contrôle de l'AMPK, elle-même influencée par l'activité physique. L'AMPK est ainsi stimulée par l'exercice et inhibée par l'inactivité physique. Une stimulation de l'AMPK réduit la concentration de malonyl-CoA, qui elle-même induit une réduction de l'inhibition de CPT1 et donc une augmentation de l'oxydation lipidique. En parallèle, l'AMPK inactive mtGPAT et induit une réduction de la synthèse de triglycérides. Dans le cas d'une diminution d'AMPK, une réduction de l'oxydation lipidique est donc observée. Or mtGPAT a une affinité plus élevée pour les acides gras saturés que pour les acides gras insaturés. De ce fait, il paraît plausible que cette voie métabolique soit une bonne candidate pour expliquer les différences d'oxydation lipidique entre acides gras saturés et insaturés [115].

Bien que les changements d'oxydation de substrats au cours de l'alitement soient indépendants de l'atrophie musculaire et des variations de la masse grasse et de la masse maigre au cours de l'alitement, les adaptations d'oxydation de substrats peuvent néanmoins être liés aux changements de type de fibres

musculaires au cours de l'alitement. Comme précisé précédemment, les adaptations à la microgravité réelle ou simulée induisent en effet des adaptations au niveau musculaire. Ainsi, une augmentation des fibres musculaires glycolytiques au profit des fibres musculaires oxydatives est constatée au cours des études de microgravité ou en cas d'inactivité physique [154]. Or, les fibres musculaires glycolytiques disposent de taux d'oxydation d'acide gras plus faible en comparaison des fibres musculaires oxydatives, notamment du fait d'une densité mitochondriale et d'une activité des enzymes oxydatives plus conséquente. Ainsi, le changement de type de fibres musculaires pourrait expliquer la réduction d'oxydation lipidique en situation de microgravité réelle, simulée ou en cas d'inactivité physique mais ce n'est pas la seule explication. Des études sur des modèles de rats suspendus ont par exemple montré une augmentation des capacités glycolytiques au sein des muscles atrophiés après quelques semaines de suspension, du fait d'une augmentation de l'expression génique de trois enzymes clés de la glycolyse, à savoir l'hexokinase, la phosphofructokinase et la pyruvate kinase. Au contraire, une réduction de l'expression d'enzymes impliquées dans la bêta-oxydation indiquait une réduction de la capacité à oxyder des lipides au sein des muscles des animaux suspendus [155]. Au-delà des changements au sein des voies métaboliques glycolytiques et oxydatives musculaires, une étude complémentaire sur un modèle de rats suspendus a également montré une augmentation des capacités de la néoglucogénèse au sein du foie des animaux suspendus. Ce phénomène pourrait contribuer à expliquer l'utilisation préférentielle des glucides au niveau musculaire [156]. Dans une autre étude menée sur des rats naturellement gras (Otsuka Long-Evans Tokushima) ayant un accès libre de 16 semaines à des cages comprenant des roues (et donc la pratique d'une activité physique), suivi d'une transition sédentaire allant de 5 heures à 173 heures, les auteurs ont observé d'une part une réduction de l'oxydation lipidique, et d'autre part, une réduction des capacités oxydatives mitochondriales. Ces modifications s'accompagnaient d'une augmentation de l'expression des protéines hépatiques, notamment de l'acide gras synthase et de l'acétyl Coenzyme A carboxylase (ACC), mais aussi d'une réduction de la phosphorylation de l'ACC et d'une augmentation de la concentration du malonyl-CoA d'origine hépatique [157]. Ainsi, cette étude indique que des altérations similaires ont lieu au sein des muscles et au sein du foie. Il semblerait ainsi que l'augmentation de la disponibilité des glucides induise une augmentation de la concentration de malonyl-CoA, responsable d'une inhibition de CPT-1 et secondairement d'une réduction de l'entrée des acides gras au sein des mitochondries et donc de l'oxydation lipidique. Cette réduction de l'oxydation lipidique induit par la suite une accumulation d'acides gras au niveau musculaire et au niveau hépatique et mène alors à une situation de stockage ectopique de lipides qui altère les fonctions des organes. Au niveau musculaire, le dépôt d'acides gras (lipides intramusculaires) se fait sous la forme de triacylglycérol, de diacylglycérol ou encore de céramides. Des publications font d'ailleurs état de l'implication des différentes formes de lipides intramusculaires dans les altérations de la sensibilité à l'insuline. Au sein de ces études, les lipides intramusculaires sont corrélés avec la sévérité de l'insulino-résistance. La production de céramides (sphingolipides dérivés du palmitate) issus de la réaction entre une sérine et un palmitoyl-CoA, permettent la formation, et sont formées à partir de la décomposition des sphingomyélines. Or la concentration de sphingomyélines dans le tissu adipeux et le plasma est associée à l'obésité. Des cytokines telles que le TNF $\alpha$  sont d'ailleurs connues pour augmenter la décomposition des sphingomyélines et donc pour augmenter la concentration des céramides [130]. Comme vu précédemment, l'inflammation joue un rôle dans l'insulino-résistance et cette voie métabolique en est un parfait exemple. Au-delà des céramides, il a également été démontré qu'une accumulation de diacylglycérol, provenant d'une augmentation de la disponibilité d'Acyl-CoA, en particulier à partir

du palmitate, affecte l'absorption de glucose stimulée par l'insuline au sein de cultures de myocytes primaires [158]. D'un point de vue mécanistique, la présence de diacylglycérol active différents isoformes de la protéine kinase C ce qui induit une inhibition de la translocation du transporteur du glucose et mène donc à une altération de l'action de l'insuline et conduit à terme au développement d'une insulino-résistance. Une autre étude menée par Shulman et al. a montré que la phosphorylation du ligand IRS et l'activation des isoformes de protéine kinase C induisent une inhibition de la kinase PI3K, réduisant ainsi la stimulation du transport du glucose et menant également à une insulino-résistance [159]. Ces données indiquent que les triglycérides ne sont pas majoritairement responsables de l'insulino-résistance médiés par les lipides au sein des muscles squelettiques. Cependant, les métabolites lipidiques tels que les longues chaînes d'acyl CoA, les diacylglycérols ou encore les céramides, qui se retrouvent en nombre en cas d'augmentation de lipides intramusculaires, paraissent être des effecteurs du développement de l'insulino-résistance et d'une inflexibilité métabolique.

#### iv. Stockage ectopique de lipides et impact hépatique

Sur la base des résultats présentés auparavant, il apparaît que l'insulino-résistance et la réduction de l'oxydation lipidique au sein des muscles squelettiques induisent une hypertriglycéridémie. Ces adaptations empêchent l'absorption des lipides par les muscles qui seront donc stockés au sein du tissu adipeux mais également au sein d'autres tissus, menant alors à un stockage dit ectopique, notamment au niveau du foie. Ce dernier est entre autres l'organe qui permet la production endogène de glucose. Il est également un site privilégié pour l'oxydation et l'estérification des acides gras ; il est aussi responsable de l'absorption et du stockage du glucose ou encore de la clairance de l'insuline [160]. Ces fonctions font de lui un organe majeur dans la régulation du métabolisme. Ainsi, sa détérioration peut induire des conséquences métaboliques et fonctionnelles importantes. À la différence d'une situation normale dans laquelle l'insuline supprime la production de glucose via l'inhibition de la glycogénolyse et la néoglycogénolyse hépatique, la suppression de la néoglucogenèse est altérée chez les individus insulino-résistants, favorisant un état d'hyperglycémie systémique. En parallèle, chez ces sujets, la lipogenèse *de novo* est maintenue voire augmentée, ce qui entretient l'hypertriglycéridémie [160].

De nombreuses publications ont effectivement noté le développement d'un stockage ectopique de lipides et des altérations hépatiques en situation d'inactivité physique provoquée, de microgravité réelle, de microgravité simulée ou encore sur des modèles d'animaux suspendus. Stettler et al. ont ainsi montré, au cours d'une étude d'alitement de seulement deux jours, une élévation des lipides intramusculaires à la suite d'un régime alimentaire riche en sucres et riche en graisses saturées. Toutefois, le régime alimentaire riche en graisses saturées induisait une augmentation plus importante des taux de lipides intramusculaires (32% contre 17%) [161]. Deux jours d'alitement n'ont pas été suffisants pour observer une relation entre les lipides intramusculaires et l'insulino-résistance. De leur côté, Cree et al. ont rapporté une corrélation négative entre le taux de lipides intramusculaires et la réduction de l'absorption du glucose après 28 jours d'alitement [127]. Ces résultats indiquent donc l'établissement d'un stockage ectopique de lipides au sein des muscles squelettiques. De la même manière un stockage ectopique de lipides a été constaté au sein même des fibres musculaires et au niveau de la moelle osseuse [162].



Des données sur différents modèles animaux suggèrent également le développement d'un stockage ectopique de lipides au niveau du foie en réponse à une suspension [156] ou à un arrêt d'exercices physiques [157] jusqu'à provoquer le développement d'une stéatose hépatique. Au sein de ce modèle animal, l'activité physique permettait de maintenir le poids, la sensibilité à l'insuline de ces animaux, tout en prévenant le développement d'un diabète de type II et permettait de réduire la stéatose hépatique en augmentant l'oxydation lipidique hépatique et en réduisant l'activité de protéines impliquées dans la *de novo* lipogenèse telles que l'acétyl-CoA carboxylase ou encore l'acide gras synthase [163]. En revanche, l'arrêt de la pratique d'activité physique au sein de cette population de rats a induit une réduction de l'oxydation lipidique et une augmentation de l'activité des enzymes clés impliquées dans la synthèse des acide gras (ACC et FAS). Les taux de malonyl-CoA étaient également augmentés suite à l'arrêt de l'activité physique. À noter que les animaux les plus inactifs montraient les atteintes les plus importantes. De ce fait, l'inactivité physique et l'arrêt d'activité physique activent des précurseurs liés au développement d'une stéatose hépatique au moins chez l'animal [157]. Une autre étude menée sur un modèle de rats suspendus a cherché à déterminer l'impact de la suspension / de l'inactivité physique sur les muscles squelettiques et sur le foie. Pour cela, les auteurs ont réalisé une combinaison de tests enzymatiques et d'analyses d'expression d'ARNm par l'intermédiaire de micropuces ARNm. Les auteurs ont montré que la suspension induisait une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la production de substrats énergétiques et de leur utilisation, notamment dans la néoglucogenèse et la lipogenèse. En particulier, l'expression d'ARNm codant pour des enzymes impliquées dans la régulation de la synthèse d'acide gras telles que la pyruvate carboxylase, l'ATP citrate lyase ou encore l'acide gras synthétase était augmentée. L'expression d'ARNm codant pour le pyruvate carboxylase, la phosphoénolpyruvate carboxykinase ainsi que la glucose-6-phosphatase, enzymes impliquées dans la voie métabolique de la néoglucogenèse, était également augmentée. Les analyses d'activités enzymatiques de ces molécules étaient en adéquation avec l'augmentation de l'expression des ARNm. L'augmentation de la disponibilité des glucides d'origine hépatique est à mettre en parallèle avec l'augmentation de l'utilisation de ces derniers par les muscles squelettiques atrophiés [156].

Différentes études chez l'Homme ont également montré le développement d'un stockage ectopique et des conséquences métaboliques et fonctionnelles au niveau du foie. Au cours de trois études d'alitement prolongé de 42, 60 et 90 jours, menées sur des hommes et femmes, une augmentation des taux d'enzymes hépatiques a été observée. En particulier, les auteurs ont remarqué une augmentation de 50% des taux d'aspartate aminotransférase (AST) et d'alanine aminotransférase (ALT). Or des études épidémiologiques ont montré qu'une élévation du taux de ces transaminases était associée à une augmentation du risque de stéatose hépatique et de diabète de type II, et ce indépendamment des facteurs de risques classiques, d'un syndrome métabolique ou des taux de protéine C-réactive [164]. Rudwill et al. ont examiné au cours d'une étude d'alitement de 60 jours les changements des concentrations plasmatiques de quatre marqueurs hépatiques connus pour être associés au développement d'une stéatose hépatique ou à une atteinte plus sévère du foie [165] à savoir l'aspartate (AST) et l'alanine (ALT) aminotransférases, la cytokératine-18 (CK18), marqueurs et prédictors de la stéatose hépatique [166, 167], l'angiopoïétine-3, une protéine plasmatique dérivée du foie qui module la clairance plasmatique des triglycérides [168] et qui augmente dans des cas sévères de stéatohépatite [169]) ainsi que deux index prédictors de détermination de stéatose hépatique non-alcoolique l'index AAC et l'index CHA. L'index AAC est l'acronyme pour AST, ALT et CK18 tandis que l'index CHA est l'acronyme pour CK18, HOMA-IR et AST. Il est à noter que l'index CHA, via

l'intégration du HOMA-IR prend en compte la notion d'insulino-résistance. Les résultats de cette étude montrent que l'alitement induit une augmentation de la concentration des 4 marqueurs hépatiques des deux index de stéato-hépatite, avec une corrélation positive entre l'élévation de la concentration des triglycérides plasmatiques à jeun d'une part, le taux de transaminases AST et les index AAC et CHA d'autre part. Ces données associées à l'observation, chez les mêmes sujets, d'un stockage ectopique au niveau de la moelle osseuse [162] et au niveau des muscles squelettiques [140], viennent compléter l'idée selon laquelle l'alitement (l'inactivité physique) induit un stockage ectopique de lipides généralisé [165].

L'ensemble des études citées ci-dessus suggère que l'inactivité physique entraîne, indépendamment de changements de balance énergétique, une réduction de la capacité à utiliser les lipides comme substrats énergétiques, une atrophie musculaire, un changement de types de fibres musculaires au profit des fibres musculaires rapides et glycolytiques, une résistance à l'insuline, une hypertriglycéridémie et un stockage ectopique de lipides. Ainsi, une hypothèse a pu être posée afin d'expliquer la cascade d'évènements qui mène aux altérations métaboliques induites par l'inactivité physique et à l'inflexibilité métabolique (Figure 8). Selon cette hypothèse, l'inactivité physique induite par l'alitement prolongé mène au développement d'une résistance à l'insuline qui nécessite une réponse hyper insulinémique pour assimiler correctement le glucose en situation postprandiale. En parallèle, l'inactivité physique induit un changement de types de fibres musculaires au profit des fibres musculaires rapides, hautement fatigables et glycolytiques. De ce fait, les muscles augmentent l'absorption et l'oxydation de glucose par des voies insulino-indépendantes, inhibant alors l'absorption et l'oxydation des acides gras au niveau musculaire et créant ainsi une élévation de la lipémie. Une hyperlipémie est alors constatée à jeun mais également après l'ingestion d'un repas due à une diminution de la clairance des lipides provenant de l'alimentation. L'augmentation du flux de lipides dans le sang entraîne également une augmentation de la quantité de lipides qui arrive aux organes, ce qui induit le développement d'un stockage ectopique de lipides au niveau de ces organes ainsi que des conséquences sur la sensibilité à l'insuline. En particulier, le foie, qui dispose d'une susceptibilité à l'hyper-insulinémie, augmente sa synthèse et son stockage lipidique jusqu'à dépasser ses propres capacités d'oxydation. Cette situation a pour conséquence le développement d'une stéatose hépatique. Avec une réduction des capacités oxydatives hépatique, une augmentation du taux de production de VLDL est constatée au niveau du foie. Ces VLDL sont alors particulièrement chargés en acides gras libres provenant de l'alimentation ainsi qu'en triglycérides issus de la néolipogénèse, ce qui entretient l'hyperlipémie et le stockage ectopique de lipides. Simultanément, le foie devient également insulino-résistant, incapable de supprimer la production de glucose, ce qui induit une augmentation de la néoglucogénèse et de l'hyper-insulinémie [115]. Au-delà de l'impact sur les muscles et le foie, d'autres organes peuvent également être impactés tels que les os, le pancréas, le cœur. Cette cascade d'évènements mène ainsi à l'établissement d'un état d'inflexibilité métabolique qui peut également évoluer et entraîner le développement d'un syndrome métabolique induit par l'inactivité physique.

Au cours de nombreuses études réalisées en situation d'inactivité physique, notamment grâce à l'utilisation du modèle d'alitement prolongé, les recherches au sein de notre laboratoire ont également pu mettre en évidence que l'inactivité physique, indépendamment de tout changement de balance énergétique, induisait le développement d'insulino-résistance [113, 152, 170], une hyperlipidémie mais aussi une altération du devenir des lipides, des changements dans les sources d'énergie oxydées

[139, 140, 152] et le développement d'un stockage ectopique de lipides [106]. Ensemble, ces modifications caractérisent l'établissement d'une inflexibilité métabolique, définie ci-après.

#### e. Définition de l'inflexibilité / flexibilité métabolique

Pendant de nombreuses années, les chercheurs ont étudié la physiopathologie de l'obésité et des maladies métaboliques qui lui sont associées en se concentrant sur les principales voies métaboliques impliquées dans la régulation du métabolisme. Les études incluaient des mesures d'absorption du glucose par les tissus périphériques, des mesures de glycolyse, de synthèse de glycogène au sein des muscles squelettiques et du foie, des mesures d'absorption et d'oxydation d'acide gras au sein des mitochondries ou encore des mesures de l'oxydation lipidique totale dans différentes conditions métaboliques (à jeun, postprandial, à l'exercice). Les scientifiques ont ainsi utilisé différents paradigmes pour créer des conditions métaboliques hautement contrôlées permettant de comprendre le rôle indépendant de chaque voie dans l'étiologie et le développement des maladies métaboliques. Bien qu'informatives, ces études fournissent une vision limitée de la régulation holistique du métabolisme. En effet, la régulation de l'homéostasie énergétique est interconnectée et nécessite l'intégration d'une multitude de régulateurs et d'effecteurs métaboliques extrinsèques et intrinsèques. Dans cette optique, le concept de la flexibilité métabolique est puissant car il représente un ensemble au sein duquel les changements d'oxydation des substrats énergétiques peuvent être examinés en regard des changements de disponibilité des substrats, et ce en fonction de l'apport alimentaire, de la demande énergétique ou des processus métaboliques périphériques. Il s'agit donc d'une évaluation intégrée de l'interaction entre les facteurs environnementaux (alimentation, activité physique, autres) et la régulation du métabolisme (organisme) [171].

La caractérisation de la flexibilité métabolique n'est cependant pas clairement établie. Plusieurs définitions de la flexibilité métabolique sont retrouvées dans la littérature et il n'y a pas de méthode standard pour la mettre en évidence. Pour autant, la flexibilité métabolique peut s'expliquer par la capacité d'ajuster l'utilisation des substrats énergétiques à la disponibilité de ces mêmes substrats au niveau cellulaire. De cette manière la flexibilité métabolique peut être déterminée dans des situations de challenge métabolique. Les premières études qui se sont intéressées au concept de flexibilité métabolique utilisaient le clamp euglycémique-hyperinsulinémique car il permettait la prise de données au sein d'un environnement contrôlé [123, 172]. Cependant ces conditions ne reflétaient pas la dynamique des réponses physiologiques repas après repas. Le challenge métabolique peut également être mis en place de par l'ingestion d'un repas riche en graisses (ou en glucides) [171] ou encore lors d'un test oral de tolérance au glucose.

Une autre méthode d'évaluation de la flexibilité métabolique est basée sur les changements entre la valeur du quotient respiratoire (QR) à jeun et la valeur du QR en situation postprandiale [173], ainsi que l'aire sous la courbe (AUC) du QR suivant l'ingestion d'un repas [121]. Le QR est calculé lors de l'analyse des échanges gazeux d'un individu par calorimétrie directe ou indirecte et correspond au rapport de la consommation de dioxygène ( $O_2$ ) sur la production de dioxyde de carbone ( $CO_2$ ). Les valeurs du QR oscillent entre 0,7 et 1. Plus le QR est proche de 0,7, plus les échanges gazeux témoignent d'une oxydation prioritaire des lipides. En revanche, lorsque la valeur du QR s'approche de l'unité, les échanges gazeux indiquent une oxydation majoritairement issue des glucides. Ainsi, en situation physiologique et au repos à distance d'un repas, les lipides sont la source énergétique oxydée

prioritairement ( $QR \approx 0,7$ ). Cependant, le QR à jeun semble être un mauvais indicateur de l'oxydation lipidique à jeun du fait qu'il soit influencé par la balance énergétique et la composition en macronutriments des repas consommés les jours précédents la prise de mesure [174].

C'est pourquoi, une autre manière de mettre en évidence la flexibilité métabolique utilise un index qui se base sur la dynamique des réponses métaboliques suite à un repas standard dans le contexte de sélection de substrats énergétiques lors de la transition entre l'état de jeun et l'état nourri (situation postprandiale). Le passage d'un état de jeun à un état nourri induit un changement dans l'utilisation des substrats énergétiques (élévation du QR), passant d'une utilisation prédominante d'acide gras (QR proche de 0,7) à une oxydation des glucides au sein des muscles squelettiques (QR proche de 1) suite à une stimulation par l'insuline. Ce changement d'utilisation des substrats permet d'utiliser les ressources énergétiques contenues dans le repas pour passer d'un état catabolique à un état anabolique où l'énergie sera stockée au sein des muscles, du tissu adipeux et du foie [117]. Il a été clairement établi que la sécrétion d'insuline en réponse à un repas est le déterminant majeur de ce changement d'oxydation des substrats. Partant de ce principe, l'insulino-résistance est un composant majeur de l'inflexibilité métabolique pouvant se mettre en place dans de nombreux tissus insulino-dépendants. De cette manière, il est possible de distinguer des individus métaboliquement flexibles et d'autres métaboliquement inflexibles.

L'index illustré en Figure 12, prend en compte la relation de la cinétique postprandiale entre le QR et l'insuline à partir des variances intra-individuelles de l'insuline et du QR non protéique (QRNP) en réponse à un repas standard. Ainsi, un sujet présentant une inflexibilité métabolique est caractérisé par une grande variance de l'insuline conjointement à une faible variance de QRNP. Ces valeurs témoignent d'un faible changement de substrats énergétiques oxydés pour une sécrétion d'insuline importante [175], et donc d'une incapacité à augmenter l'oxydation des glucides en réponse à un repas standard. Au contraire, les individus métaboliquement flexibles se caractérisent, toujours suite à un repas standard, par une légère augmentation de la variance de la concentration d'insuline pour une grande variation dans l'utilisation des substrats énergétiques (grande variation du QR vers une oxydation des glucides). À titre d'exemple, à jeun, les sujets métaboliquement inflexibles oxydent peu de lipides par rapport aux sujets métaboliquement flexibles. De plus, suite à un repas, les sujets métaboliquement inflexibles auront une faible variation du QR, alors qu'une grande variation entre avant et après repas sera constatée au sein de sujets flexibles. Par ailleurs, pour une même variation de QR, une inflexibilité métabolique nécessitera la sécrétion d'une quantité beaucoup plus conséquente d'insuline en comparaison d'une situation de flexibilité métabolique. Ainsi, les sujets métaboliquement inflexibles sont sujets au développement d'une insulino-résistance.

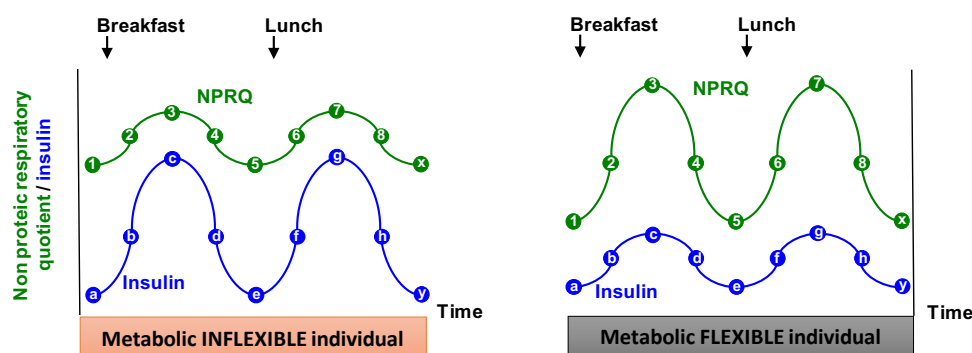


Figure 12 : Index de flexibilité et inflexibilité métabolique expliquée à travers les cinétiques de QRNP et de la concentration d'insuline au cours d'une journée. (Adapté de la publication de Bergouignan et al. 2012)

Rynders et al. ont également proposé une définition élargie de la flexibilité métabolique selon laquelle toute réponse métabolique à un stress, qu'il soit environnemental ou physiologique peut apporter une information sur la flexibilité métabolique [171]. En ce sens, l'étude de la flexibilité métabolique nécessiterait la présence d'un facteur de stress, d'un régulateur et d'un effecteur. Dans ce cas, la relation entre le régulateur et l'effecteur en réponse au stress est mesurée au cours d'une expérience et informe sur la flexibilité métabolique. Ainsi, en reprenant les conditions du clamp euglycémique-hyperinsulinémique, le clamp représente le facteur de stress métabolique tandis que l'évolution de la relation entre la perfusion d'insuline (régulateur) et la variation du QR informe sur la flexibilité métabolique. Ceci n'est qu'un exemple parmi les nombreuses situations qui peuvent permettre d'examiner la réponse d'un effecteur à un régulateur pour mettre en évidence une dérégulation métabolique. Bien que ces scénarios puissent être considérés simplistes dans la situation métabolique in vivo, le triptyque facteur de stress-régulateur-effecteur comme index de flexibilité métabolique peut s'avérer utile et conduire à de nouvelles connaissances sur la physiopathologie intégrative de l'obésité et du diabète. Suite à cette revue de littérature, il apparaît que les différentes adaptations métaboliques causées par la microgravité réelle et/ou simulée sont importantes et font intervenir des systèmes qui sont interconnectés au sein de l'organisme et qui mènent aux changements de type de fibres, aux changements d'oxydation de substrats énergétiques, induisent une insulino-résistance, des altérations mitochondriales, et entraînent un stockage ectopique de lipides au sein d'organes clés du métabolisme. L'ensemble de ces adaptations favorise et se traduit par l'établissement d'une inflexibilité métabolique sur la base de l'hypothèse proposée par notre équipe (Figure 13).

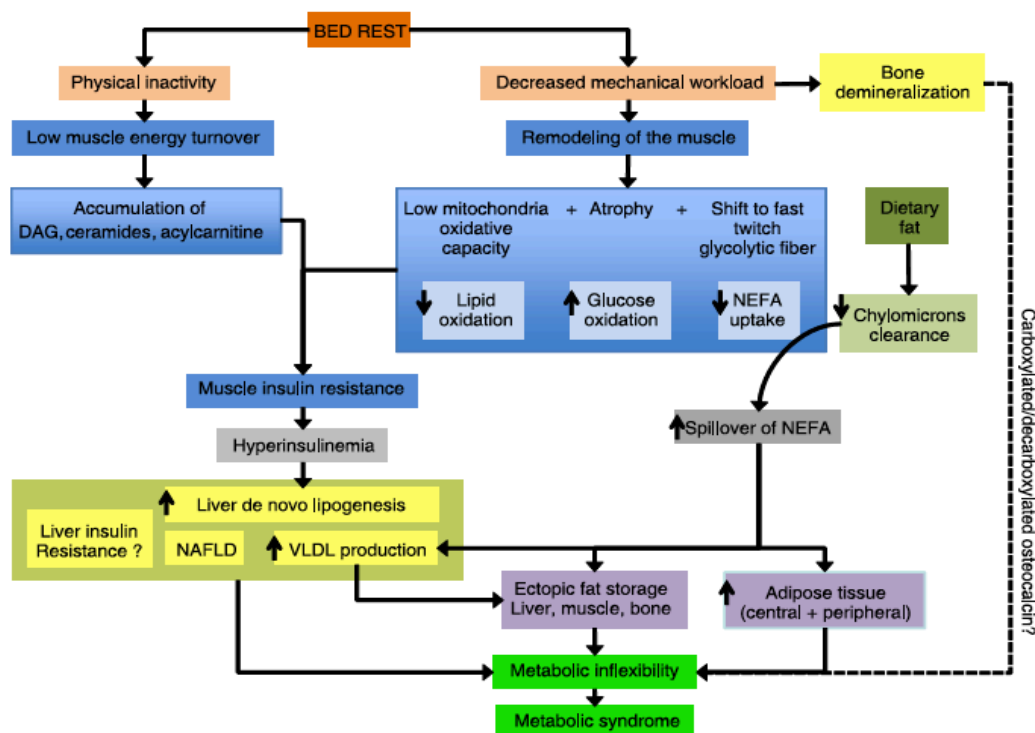


Figure 13 : Cascade d'altérations métaboliques hypothétique permettant d'expliquer le développement d'une inflexibilité métabolique induite par l'alitement prolongé. (Adapté de Bergouignan et al. 2011).

Les mécanismes, la chronologie et la séquence des évènements et les liens de cause à effets menant à l'ensemble de ces adaptations restent toutefois à déterminer. Par ailleurs des solutions doivent être mises en œuvre pour maintenir l'ensemble des systèmes physiologiques intacts. Pour la plupart des situations de microgravité simulée ou lors des expérimentations sur modèles animaux, une incapacité des sujets à maintenir une activité physique n'est pas la principale cause de préoccupation, mais plus la raison pour laquelle les sujets ne parviennent pas/plus à exercer un effort donné. Au contraire, la situation des vols spatiaux est différente. En effet, au cours des missions spatiales, les astronautes ne bénéficient pas de périodes de récupération. Il est donc indispensable de maintenir aussi fonctionnelles que possible les capacités des astronautes afin de garantir le bon déroulement des tâches à bord de la station, des sorties extravéhiculaires (maintenance, réparation, cas d'urgence) car l'ensemble de ces actions nécessitent un effort soutenu.

Il paraît évident qu'une augmentation de la fatigabilité due à un changement d'oxydation des substrats et des types de fibres musculaires au cours des missions spatiales est contre-productif. Des solutions doivent donc encore être apportées et cela passe par le développement de diverses contremesures.

#### 4. Historiques et évolution des contremesures

Au cours des missions spatiales qui se sont déroulées jusqu'à maintenant et pour les futures missions de plus longue durée prévues dans les prochaines décennies, le maintien de l'intégrité des astronautes pendant et après les missions est, et restera primordial [80]. Sans contremesure, les conditions spatiales induiraient donc une multitude d'adaptations potentiellement dangereuses pour les équipages, pour le succès de la mission et pour le retour sain et sauf des astronautes. Ainsi, les agences spatiales ont depuis longtemps travaillé sur différentes contremesures afin de prévenir/limiter les adaptations engendrées par la microgravité. Les connaissances requises pour élaborer des contremesures efficaces proviennent à la fois de l'expérience des vols spatiaux en orbite terrestre basse de durée relativement courte mais aussi sur les études approfondies au sol portant sur les modèles humains d'alitement [20] ainsi que sur des études animales mécanistiques [80]. Les modèles terrestres représentent une opportunité précieuse pour l'évaluation des contremesures car ils permettent d'étudier l'impact des contremesures sur un nombre importants de sujets, dans des conditions expérimentales contrôlées, tout en étant moins onéreuses que les missions spatiales. En particulier le modèle d'alitement prolongé est le plus utilisé pour évaluer les différentes contremesures. La pratique d'activité physique reste la contremesure la plus étudiée à ce jour mais d'autres contremesures ont également été testées comme l'atteste cette liste non exhaustive des études d'alitement prolongées conduites dernièrement par l'ESA (Table 1).

Table 1: Liste des études d'alitement prolongé menées par l'ESA depuis les années 2000. (Adapté de Demontis et al. 2017)

| Name       | Year      | Place, subjects               | PRE (d) | HDT (d) | POST (d) | Intervention   | HDT angle |
|------------|-----------|-------------------------------|---------|---------|----------|--|-----------|
| LTBR 01-02 | 2001/2002 | Toulouse, 25 males            | 15      | 90      | 15       | 1) Flywheel exercise 2) Bisphosphonate   | -6°       |
| STBR 01-02 | 2001/2002 | Cologne, 9 males. Cross-over  | 9       | 14      | 3        | Caloric variations in nutrition, Amino acid infusion   | -6°       |
| BBR        | 2003/2004 | Berlin, 20 males              | 3       | 56      | 6        | Vibration exercise   | 0°        |
| WISE       | 2005      | Toulouse, 24 females          | 20      | 60      | 20       | 1) Combined resistive exercise, aerobic exercise, Lower Body Negative Pressure 2) Nutritional supplement                       | -6°       |
| BBR2-2     | 2007/2008 | Berlin, 24 males              | 9       | 60      | 7        | 1) High-load resistive exercise (RE) 2) RE+ whole-body vibration   | -6°       |
| BR-AG1     | 2010      | Toulouse, 12 males Cross-over | 5       | 5       | 5        | 1) Artificial gravity by daily short-arm centrifuge for: 30 min 2) Intermittent 6x 5 min                                       | -6°       |
| SAG        | 2010/2011 | Cologne, 10 males Cross-over  | 5       | 5       | 5        | 1) Locomotion replacement training 2) Upright standing   | -6°       |
| MEP        | 2011/2012 | Cologne, 10 males Cross-over  | 7       | 21      | 6        | Combined supplementation of 0.6 g whey protein (WP)/kg body weight (BW) and 90 mmol potassium bicarbonate (KHCO <sub>3</sub> ) | -6°       |
| MNX        | 2012/2013 | Toulouse, 12 males Cross-over | 7       |         | 6        | 1) Resistive Vibration Exercise (RVE) 2) RVE + Nutritional Supplement  | -6°       |
| RSL        | 2015/2016 | Cologne, 24 males             | 14      | 60      | 14       | Reactive jump  | -6°       |
| TBD        | 2017/2018 | Toulouse, 20 males            | 14      | 60      | 14       | Cocktail   | -6°       |

TBD, to be defined; d, duration (days) of the different bed rest phases (PRE, before; HDT, head-down tilt; POST, after HDBR). Cross-over, subjects repeated the study, first in the control group, then in the countermeasure one.

Parmi ces dernières on retrouve la vibration, la stimulation électrique, la centrifugation, l'utilisation de produits pharmacologiques ou encore des suppléments nutritionnels.

La trajectoire générale du développement et de l'évaluation des contremesures suit un chemin prévisible de développement allant de l'évaluation de la contremesure au sol, des tests initiaux sur des sujets ambulatoires dans des conditions de gravité terrestre (1G), un raffinement utilisant l'un des modèles d'étude les moins coûteux comme la suspension des membres ou le vol parabolique. L'efficacité des contremesures est ensuite évaluée via des études d'alitement avant de les optimiser au cours des vols spatiaux. Cette approche permet de tester l'efficacité de nombreuses contremesures et combinaisons en utilisant des ressources facilement adaptées à un grand nombre de sujets, en affinant progressivement les contremesures et en utilisant des modèles d'étude de plus en plus complexes et coûteux. Étant donné le nombre limité d'astronautes au sein des missions spatiales et les coûts liés à la conduite de recherches, la validation des contremesures en vol doit représenter la dernière étape du développement des contremesures (Figure 14). Une fois qu'une contremesure est rendue opérationnelle, elle doit encore être évaluée. Les contremesures sont optimisées avec un petit groupe de 6 à 12 astronautes et doivent ensuite être ajustées pour chaque astronaute. Cela implique un cycle de mise en œuvre d'une contremesure, de contrôle de son efficacité (ou d'un substitut de son efficacité) en vol, et d'ajustement périodique en fonction de la réponse individuelle. Ce pourrait être le cas pour l'ajustement de la dose de médicaments, la prescription d'un programme d'exercices ou encore le changement de régime alimentaire [20].

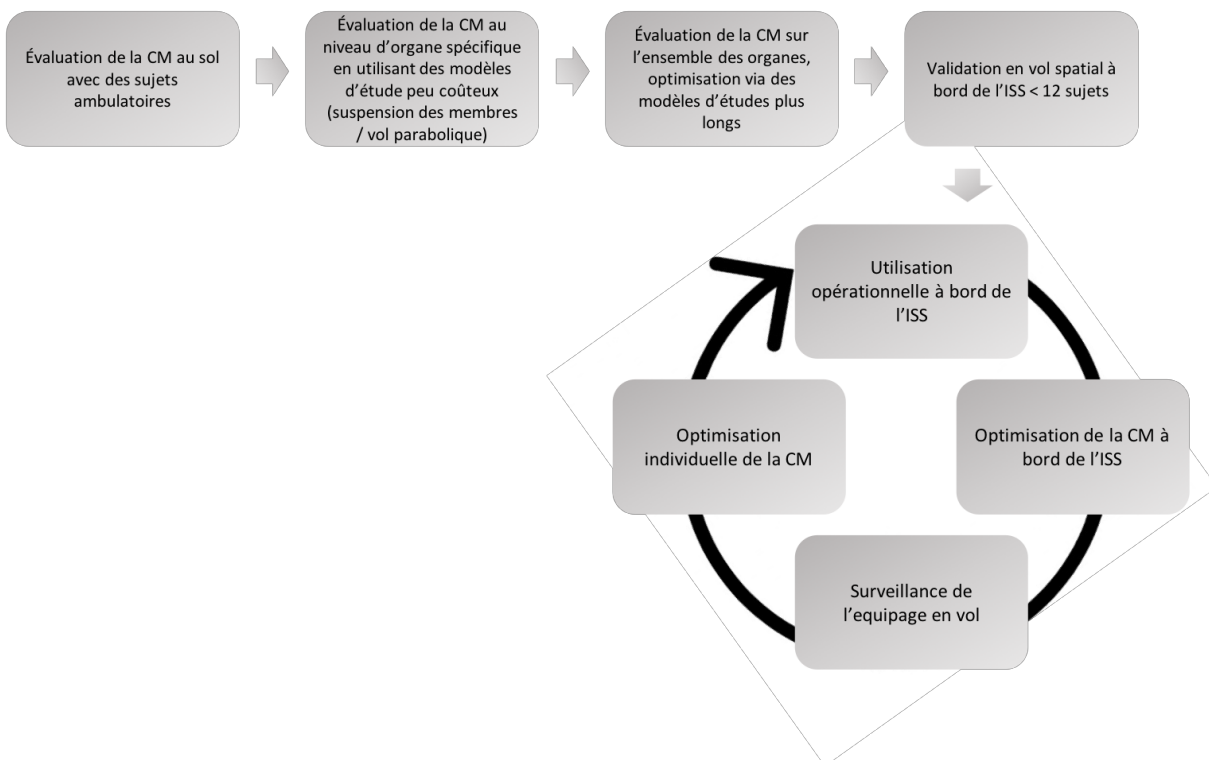


Figure 14 : Progression de l'évaluation des contremesures. (Adapté de Poultz-Snyder et al. 2016)  
 CM : contremesure ; ISS Station Spatiale Internationale)



#### a. Contremesure d'exercice

Depuis le premier vol spatial de Youri Gagarine, les agences spatiales internationales ont mis en place des systèmes pour lutter contre les conditions de microgravité rencontrées au cours des missions spatiales. À la fin des missions spatiales, avant le retour sur Terre, les agences spatiales ont instauré l'utilisation d'appareils qui induisent une pression négative au niveau des jambes de sorte à entraîner un déplacement des fluides corporels vers les membres inférieurs et ainsi permettre de lutter contre l'intolérance orthostatique des astronautes au moment de retourner sur Terre [176]. Ce système a été utilisé lors des missions mir, Skylab ainsi que lors du programme qui engageait des navettes spatiales. Au-delà de l'induction de pression négative au niveau des membres inférieurs, les astronautes ingèrent une boisson salée (6-9g de NaCl dans 900-1200ml d'eau) de manière à améliorer la tolérance orthostatique. De cette manière, l'ingestion d'un litre de solution saline couplée à une pression négative (-30 mmHg) 4 heures par jour avant une rentrée atmosphérique a induit une réduction du rythme cardiaque et une plus faible réduction de la pression systolique en comparaison d'astronautes n'ayant pas bénéficié de la pression négative. Ce programme semble donc bénéfique mais l'obligation d'utilisation de ces appareils au moins 4-5 heures par jour rend cette solution impraticable pour les astronautes [10].

Ce n'est que dans les années 1960 que l'activité physique a été préconisée au cours d'une étude d'alitement prolongé dans le but d'atténuer les effets indésirables de l'alitement, soit ce que l'on appelle aujourd'hui une contremesure d'exercice. Au vu de l'importance donnée à l'exercice physique, il n'est pas étonnant que l'activité physique soit la pierre angulaire des contremesures au cours des missions spatiales. En effet l'exercice physique a été utilisé pendant plus de 50 ans lors des missions spatiales, et ce à commencer par le programme américain Gemini [20]. L'activité physique pratiquée au cours des missions spatiales était premièrement de type aérobie de par l'utilisation de rameurs, de cyclo-ergomètre et de tapis de courses [11]. Les astronautes de la station Mir avaient pour recommandations de pratiquer deux à trois heures d'exercice physique trois jours sur quatre et particulièrement via des exercices avec un harnais élastique et de la course sur tapis. Pour autant cette contremesure d'exercice n'était pas suffisante pour lutter contre la perte osseuse [177]. Grâce à l'utilisation du cyclo-ergomètre, les études ont noté une réduction de 4% de la densité osseuse au sein de la colonne lombaire et une réduction de 10% au niveau du fémur suite à un vol spatial allant de quatre à six mois [178]. Ainsi, le cyclo-ergomètre ne semble pas non plus complètement efficace comme contremesure pour lutter contre la perte osseuse au cours des vols spatiaux de longue durée. De même, une activité physique aérobie d'intensité modérée pratiquée régulièrement dans des conditions microgravitaires s'est révélée insuffisantes pour maintenir les capacités cardiovasculaires des astronautes en retour de mission spatiale [11].

À bord de l'ISS, les astronautes allouent deux heures et demie par jour, six jours sur sept à la pratique d'exercices physiques. Ce temps inclut également le temps de s'équiper, la reconfiguration des appareils et l'hygiène personnelle [179]. Il a été prouvé que les exercices à haute intensité été plus efficaces que les entraînements aérobies en situation de microgravité [180]. De ce fait, les agences spatiales internationales ont décidé d'implanter un appareil à bord de l'ISS qui permettrait la pratique d'exercices résistifs. Ainsi en 2000, l'appareil d'exercice résistif provisoire (iRED) a été assemblé.

Huit ans plus tard, l'appareil d'exercice résistif avancé (ARED) a été lancé pour être implanté au sein de la station spatiale internationale. L'iRED permet la réalisation de huit exercices résistifs différents tandis que l'ARED permet la réalisation des mêmes huit exercices de l'iRED mais ajoute également la possibilité de s'exercer sur neuf autres mouvements résistifs [179]. L'iRED dispose d'un équivalent de charge maximale de 1337N et d'une force excentrique qui équivaut à 60-80% de la force concentrique. Par ailleurs l'ARED permet une charge maximale de 2675N et une force excentrique équivalente à 90% de la force concentrique. De cette manière, l'appareil ARED a une plus grande capacité de résistance par rapport à l'iRED [181]. Ceci a été confirmé par des études en vol. Comparativement à l'utilisation de l'iRED, l'ARED a permis d'améliorer les changements de force iso-cinétique dans les muscles de la cuisse au cours d'une mission spatiale allant de 60 à 190 jours à bord de l'ISS. Avec l'utilisation de l'iRED, une réduction de 6 et 12% de la densité et de la composition osseuse était constatée au niveau du bassin et des hanches au cours d'une missions spatiale de 4-5 mois. L'utilisation de l'ARED dans ces conditions a induit une diminution de l'atteinte osseuse avec une densité et une composition osseuse qui n'étaient pas différentes de celles observées avant le vol spatial [182]. Bien que bénéfique par rapport à l'utilisation de l'iRED, une utilisation excessive des appareils résistifs, en particulier avec des niveaux de charge trop importants, induisent des blessures de fatigue qui requiert une attention particulière [10].

Par ailleurs la contremesure proposée par l'utilisation du système ARED au sein de la station spatiale internationale n'a pas complètement prévenu les dégradations musculaires et cardiaques rencontrées en vol. Ainsi, il apparaît que les atrophies musculaire et cardiaque ne soient pas exclusivement dues à l'inactivité physique. Les mécanismes liés à la gravité peuvent aussi être impliqués dans ces adaptations [183]. En effet, les réflexes via les capteurs de gravité, comme la contraction musculaire pour le contrôle postural et le contrôle vestibulo-cardiovasculaire sont atteints en situation de microgravité et conduisent à une atrophie du myocarde et des muscles squelettiques impliqués dans le maintien postural. Afin de prévenir ces adaptations, l'utilisation d'un autre type de contremesure telle que la gravité artificielle combinée à la pratique d'exercices physiques pourrait se montrer des plus intéressante. Des études d'alitement se sont intéressées aux contremesures d'exercice incluant la gravité artificielle ou la vibration. Des protocoles de vibration à haute et basse fréquence ont également été proposés et testés au cours d'études de microgravité simulée. Bien que les protocoles de vibration à basse fréquence aient montré des effets protecteurs sur l'os dans des modèles animaux et au cours d'études sur des individus humains en ambulateur, les effets bénéfiques étaient plus limités lorsque les tests ont été réalisés au cours d'études d'alitement prolongé. En revanche, les études qui impliquaient l'utilisation de protocoles de vibration à haute fréquence, également appelés exercices de résistance par vibration, ont généralement montré des effets positifs au niveau musculaire et osseux au cours d'études d'alitement [1].

Le débat se poursuit sur le potentiel de ce protocole de contremesure face aux inquiétudes concernant la sécurité des expositions répétées aux vibrations qui pourraient conduire à des dommages neuromusculaires [1]. Pour autant, une étude d'alitement de 60 jours qui comparait l'impact d'exercices résistifs courts (5-6 minutes) pratiqués trois jours par semaine avec ou sans vibration a mis en évidence que les deux types de pratique se montraient efficace pour réduire la perte de volume musculaire, les dommages musculaires et la douleur ressentie au sein des muscles des membres inférieurs [184].

Concernant la gravité, il est établi que les conditions de gravité terrestre (1G) maintiennent l'os tandis que la microgravité induit une perte osseuse. Cependant, une question reste en suspens. De quelle

gravité avons-nous besoin ? Une étude d'alitement avait montré que des périodes de deux ou quatre heures de station debout ou de marche atténuaient l'augmentation de l'excrétion urinaire de calcium induit par l'alitement. Une étude plus récente a également utilisé la centrifugation afin de créer une gravité artificielle au cours d'un alitement prolongé de 21 jours. L'étude a ainsi démontré qu'une exposition d'une heure à une gravité de 1G au niveau du cœur et de 2,5G au niveau des pieds était efficace pour prévenir les effets de la microgravité sur les systèmes cardiovasculaires et musculaires. Cependant, cette contremesure n'a pas eu d'impact sur le métabolisme osseux et calcique.

D'autres études comme celle menée par Alkner et al. s'est intéressée aux changements de volume musculaire au sein des muscles extenseurs du genou et du muscle fléchisseur plantaire au cours d'une étude d'alitement de 29 jours avec ou sans pratique régulière (tous les 3 jours) d'exercices résistifs sur un ergomètre indépendant de la gravité (Figure 15) [185]. Cette étude a montré que la pratique d'exercices de résistance avec le système d'ergomètre indépendant de la gravité atténue l'atrophie musculaire du triceps sural et du quadriceps au sein de sujets alités, et se présente comme un atout important pour les voyageurs spatiaux.

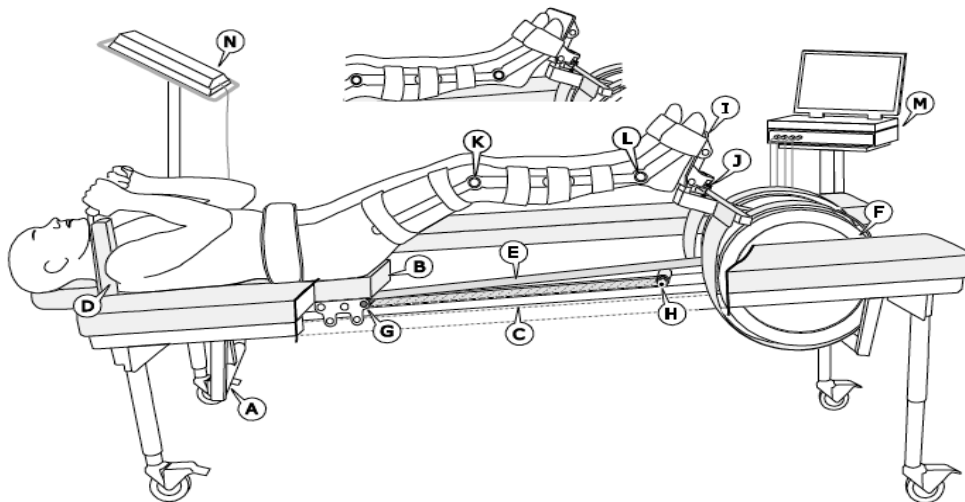


Figure 15 : Schéma représentant un sujet exécutant un squat sur un ergomètre indépendant de la gravité. (Alkner et al. 2004)

D'autres études ont également suggéré l'intérêt de l'utilisation de la gravité artificielle comme contremesure en comparant l'impact d'un alitement de cinq jours sans contremesure ou avec 30 minutes de gravité artificielle par jour pendant 5 jours et 30 minutes d'exposition à la gravité artificielle fractionnée en six périodes de 5 minutes. D'après l'étude de Linnarsson et al., le protocole de fractionnement de gravité artificielle a été mieux toléré par les volontaires et a également induit une meilleure tolérance orthostatique comparé aux autres protocoles mais n'a pas eu d'impact sur la capacité aérobie [186]. Malgré cela, il semble que la centrifugation intermittente puisse être une des contremesures à employer pour maintenir les fonctions physiologiques lors des futures missions spatiales [187]. À l'avenir, de nouvelles études devraient s'intéresser aux protocoles de gravité artificielle de manière intermittente au cours d'études d'alitement prolongé de plus longue durée et devraient également être combinées avec un protocole d'activité physique [186]. Plusieurs agences spatiales internationales ont entamé différents programmes de recherche en ce sens [11]. L'un d'entre eux s'intéresse à la pratique d'exercices physiques en condition de pression négative au niveau des membres inférieurs. Ce concept a été testé au cours d'une étude d'alitement de 30 jours. Les sujets recrutés pour cette étude étaient des jumeaux, ce qui permettait d'augmenter la puissance des comparaisons avant et après alitement [188]. Le protocole d'exercices physiques consistait à courir 40 minutes par jour, six jours par semaine sur 30 jours au sein d'un système qui permettait de rester en position allongée tout en étant en condition de pression négative au niveau des membres inférieurs (Figure 16).

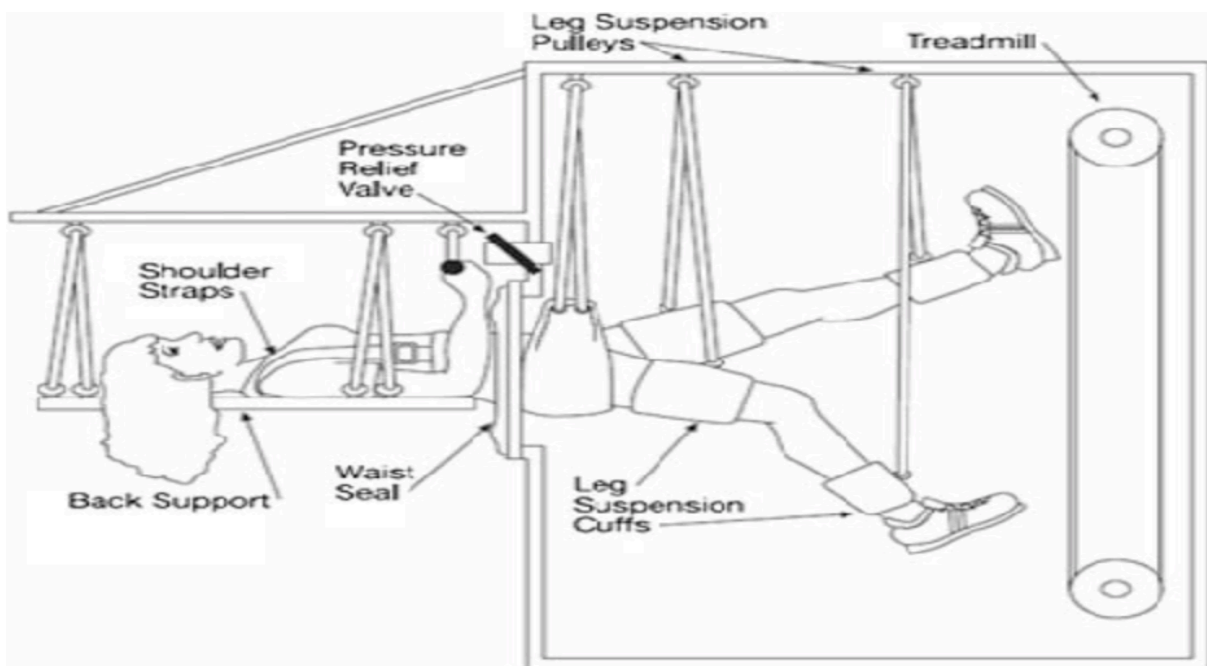


Figure 16 : Système permettant la pratique d'une activité physique aérobie sur tapis roulant en condition de pression négative au niveau des membres inférieurs tout en restant allongé (Adapté de Guinet et al. 2009).

La pratique d'activité aérobie a permis de maintenir le volume plasmatique et la vitesse de sprint. La tolérance orthostatique a aussi été maintenue à un certain degré, ainsi que la force et l'endurance musculaire. Des résultats similaires ont été obtenus au cours d'un alitement de 60 jours au cours duquel les sujets pratiquaient l'activité aérobie sur tapis en condition de pression négative au niveau des membres inférieurs ainsi qu'un protocole d'activité physique de type résistif. Les résultats indiquaient une augmentation de la masse cardiaque au sein du groupe soumis au protocole d'exercice. De plus, la pratique d'exercices a permis de préserver la force et l'endurance musculaire ainsi que la capacité aérobie. La tolérance orthostatique a elle aussi été partiellement maintenue. Néanmoins, la possibilité de fournir de tels dispositifs sur un vaisseau spatial constituera un défi technique. En prévision d'une mission d'exploration vers Mars, il sera nécessaire de développer une contremesure intégrée et compacte pour le succès de la mission [10].

Bien qu'efficaces à bien des égards, les contremesures d'exercice ont également montré leurs limites au cours de différentes études d'alitement. À titre d'exemple, une étude d'alitement de 90 jours qui incluait 35 minutes d'exercices résistifs tous les trois jours et l'étude d'alitement de 60 jours qui cumulait la pratique d'exercices résistifs pendant 35 minutes tous les 3 jours associée à une activité aérobie à raison de 45 minutes 3-4 fois par semaine à 40-80% de  $VO_2max$  n'ont pas permis de lutter, ni contre le développement d'insulino-résistance, ni contre la mise en place d'une hypertriglycéridémie, ni contre la réduction des capacités oxydatives des lipides induits par l'alitement [139, 140]. De plus, des critiques ont été émises à l'encontre des programmes d'exercices physiques au cours des missions spatiales. La raison des critiques était due au fait que le coût de l'exercice dans l'espace était plus élevé que sur Terre et que la charge importante d'exercices contribuait de manière significative à la balance énergétique négative observée en vol chez les astronautes [154, 189]. Sur la base de ces observations, de nouvelles contremesures ont été développées, telles que les contremesures pharmacologiques mais aussi et surtout les contremesures nutritionnelles au cours de la dernière décennie.

#### b. Contremesure pharmacologique

Les contremesures pharmacologiques ont été utilisées en complément des contremesures d'exercice car il était difficile de mettre en évidence les effets positifs de l'exercice physique au niveau osseux [1]. En effet, suite à l'incorporation d'un programme d'activité physique à bord de la station Mir, une perte locale de 1-1,6% par mois de densité osseuse a tout de même été mise en évidence. Par ailleurs, la pratique d'exercices physiques en condition de microgravité peut prendre beaucoup de temps, et dans certaines situations, la pratique d'exercice physique peut ne pas être adéquat (urgence, maladie, blessure). Dans ce cas, d'autres contremesures se révèlent nécessaires, comme cela peut être le cas pour les contremesures pharmacologiques. De plus, contrairement à une contremesure d'exercice, une intervention biochimique efficace ne mobiliserait que peu de temps d'équipage, peu d'espace de stockage et aucun surplus d'alimentation [190]. De cette manière, des études en vol et d'alitement prolongé ont évalué l'impact de bisphosphonates pour inhiber la résorption osseuse [1]. Ainsi, l'ingestion orale d'etidronate et de clodronate a été testée comme contremesure au cours d'une étude d'alitement de vingt semaines pour lutter contre les pertes osseuses dues à l'inactivité. Les résultats ont montré que l'ingestion de 20mg/kg/j d'etidronate induisait une balance calcique positive au cours des huit dernières semaines d'alitement. Pour autant l'etidronate et le clodronate sont maintenant interdits car ils sont associés à une accumulation de tissu

ostéoïde chez l'animal et chez l'Homme lorsqu'ils sont administrés aux doses anti-résorptives pendant de longues périodes [190, 191].

Plus tard d'autres études d'alitement ont étudié l'impact d'autres contremesures pharmacologiques à base d'alendronate par voie orale ou encore l'utilisation intraveineuse d'acide zolédronique [1]. Une première étude a étudié l'impact de la consommation de 20mg/j d'alendronate au cours d'une période pré-alitement de deux semaines, suivie d'une période d'alitement de trois semaines. La population de cette étude était composée de seize hommes répartis en un groupe placebo (n=8) et un groupe traité à l'alendronate (n=8). Au cours des deux premières semaines de l'étude, le groupe traité à l'alendronate montrait une réduction de l'excrétion calcique urinaire comparé au groupe placebo. Au cours de la période d'alitement les deux groupes ont montré une augmentation de l'excrétion calcique urinaire. Pour autant l'excrétion calcique urinaire au sein du groupe supplémenté en alendronate était inférieure à l'excrétion calcique urinaire du groupe placebo avant l'alitement. Ainsi, la supplémentation de 20mg/j d'alendronate semble efficace pour lutter contre la perte osseuse.

Une autre étude s'est intéressée aux effets de la consommation de 10mg/j d'alendronate comme contremesure au cours d'une étude d'alitement de 17 semaines. L'étude portait sur une population de 21 adultes masculins répartis en un groupe contrôle (n=13) et un groupe traité à l'alendronate (n=8). Au cours de l'alitement, le groupe contrôle a montré une réduction de la densité minérale osseuse, exceptée au niveau des bras et du radius. Le groupe traité n'a montré aucune perte de densité minérale osseuse sauf au niveau du calcaneum dont la densité osseuse a été réduite d'environ 5% au sein du groupe traité par rapport à 10% au sein du groupe contrôle. Contrairement au groupe contrôle, la densité minérale osseuse du col du fémur a augmenté au sein du groupe traité à l'alendronate. De même, le traitement à l'alendronate a également permis de conserver une meilleure densité minérale osseuse au niveau de la colonne vertébrale, du pelvis et du trochanter. Au-delà de la densité minérale osseuse, des analyses portant sur les changements de concentration des marqueurs et hormones osseux ont également été réalisées. Les résultats de l'étude portent d'une part sur l'évolution de la concentration de marqueurs de résorption osseuse comme le marqueur n-télopeptide (NTx), la pyridinoline totale urinaire (DYP), la désoxypyridinoline (DPD) ou encore l'hormone parathyroïdienne (PTH) ; d'autre part, sur l'évolution de marqueurs de formation osseuse tels que l'ostéocalcine, l'alcaline phosphatase et la vitamine D. Les résultats de l'étude indiquent que les marqueurs de résorption osseuse ont tous augmenté au sein du groupe contrôle ainsi que le taux de parathormone. Au sein du groupe traité à l'alendronate, il était noté une réduction de la concentration du marqueur de résorption osseuse NTx tandis que les deux autres marqueurs de résorption osseuse (PYD et DPD) ont été réduits en conséquence de l'alitement, mais d'une manière significativement moindre comparée à celles constatées au sein du groupe contrôle. Au sein du groupe contrôle, la concentration des marqueurs de formation osseuse n'a pas évolué au cours de l'alitement tandis que la concentration de ces marqueurs a été réduite au sein du groupe traité à l'alendronate. Ce phénomène est expliqué par le fait que le traitement à l'alendronate entraîne une inhibition du remodelage osseux. Plus encore, l'excrétion urinaire calcique a augmenté au sein du groupe contrôle tandis que le groupe traité a montré une réduction de l'excrétion urinaire calcique.

Ensemble, les résultats de cette étude démontrent que le traitement à l'alendronate est une contremesure pharmacologique efficace pour lutter contre les adaptations osseuses engendrées par les conditions de microgravité simulées (alitement prolongé) bien qu'elle ne prévienne pas complètement la perte osseuse [190].

L'ingestion d'alendronate a également été utilisée comme contremesure en vol, et combiné à une contremesure d'exercice, l'ARED, cité plus haut. Au cours de cette étude, la prise de bisphosphonates débutait trois semaines avant le début du vol spatial et continuait au cours du vol. La dose allait de 70mg/semaine, correspondant au dosage utilisé lors du traitement de l'ostéoporose, à 140mg/semaine pour prévenir l'ostéoporose au cours de la mission spatiale [192]. Cette étude a montré que la combinaison de la pratique d'exercice, via l'ARED, couplée à l'ingestion de bisphosphonate permettait de maintenir la densité et la composition minérale osseuse au cours d'une mission spatiale. Cependant, l'interprétation des résultats concernant l'impact de cette contremesure pose des problèmes car les sujets qui avaient ingéré l'alendronate utilisaient l'ARED, tandis que les sujets contrôle avaient utilisé l'iRED [1]. Bien que les effets secondaires à court et à long terme demeurent préoccupants pour tout agent pharmacologique, les bisphosphonates pourraient constituer un outil potentiel pour les missions d'exploration qui ne comprendraient pas d'équipement pour la pratique d'exercice physique important.

La testostérone est un autre composé pharmacologique qui a été utilisé pour atténuer la perte musculaire et osseuse associée aux vols spatiaux. Cette proposition se basait sur certaines données qui ont mis en évidence une réduction du taux de testostérone circulant en condition de vols spatiaux réels [193] ou simulés [194]. Cependant, une publication de Smith et al. a montré que les vols spatiaux de longue durée (entre 48 et 215 jours) et les études d'alitement prolongé (entre 60 et 90 jours) n'induisaient pas de réduction du taux de testostérone [195]. Smith et al. ajoutent qu'une réduction du taux de testostérone a pu être mise en évidence car les astronautes participant à cette étude se trouvaient en balance énergétique négative, en particulier le jour de la collection des échantillons. Or un déficit énergétique de courte ou de longue durée est associé à une réduction du taux circulant de testostérone [195]. Bien que l'apport exogène de testostérone puisse stimuler le système musculaire et osseux, la supplémentation en testostérone reste difficile compte tenu des effets secondaires et des autres problèmes liés à ce type de traitement dans un environnement de microgravité [1, 194].

Pour l'heure, les contremesures pharmacologiques étaient développées et utilisées dans le but de prévenir des adaptations osseuses engendrées par la microgravité réelle et simulée. Toutefois, comme vu précédemment, les conditions de microgravité entraînent de nombreuses autres adaptations sur lesquelles l'impact des contremesures pharmacologiques est nul ou très limité. Les adaptations métaboliques causées par le manque d'activité en condition de microgravité sont conséquentes pour les astronautes et les sujets qui participent aux études de microgravité simulée. Ainsi, trouver une contremesure pharmacologique qui permettrait de prévenir de l'hyperlipidémie et qui contrebalancerait le développement de l'insulino-résistance et d'une inflexibilité métabolique serait une avancée majeure pour les futures missions de longue durée.

En parallèle, un autre type de contremesure a gagné un réel intérêt au cours de la dernière décennie, il s'agit des contremesures nutritionnelles.

### c. Contremesure nutritionnelle

La nutrition joue des rôles multiples au cours des vols spatiaux, en fournissant suffisamment de nutriments pour répondre aux besoins métaboliques de l'organisme et ainsi maintenir la santé des astronautes mais est aussi impliquée dans les aspects psychosociaux bénéfiques liés aux repas. De ce fait la nutrition peut être un élément clé pour lutter contre les adaptations induites par les conditions spatiales.

Au vu de l'augmentation des durées des missions spatiales, toute carence nutritionnelle deviendrait préjudiciable pour les membres d'équipages engagés. En ce sens, en vue des prochaines missions spatiales de longue durée et à terme pour l'exploration humaine vers Mars, le désir des agences spatiales internationales est de développer des contremesures qui permettent de protéger autant de fonctions physiologiques que possible, sans affecter d'autres fonctions de l'organisme, le tout en étant le plus facilement utilisable au cours des missions spatiales. Les contremesures nutritionnelles s'avèrent des plus intéressantes car elles permettent de minimiser la charge de lancement, le temps d'équipage et les inconvénients ainsi que les risques d'effets secondaires [196]. Ces avantages font que les contremesures nutritionnelles ont connu un gain d'intérêt et ont été développées au cours des dernières années. L'alimentation comporte non seulement des macronutriments (glucides, lipides, protéines) mais aussi un ensemble complexe de micronutriments bioactifs (vitamines, minéraux) nécessaires au maintien d'un état de santé optimal. Les contremesures nutritionnelles doivent garantir un régime alimentaire équilibré et éviter l'apport de calories vides pour garantir le bon déroulement des missions spatiales. C'est pourquoi l'apport énergétique, les besoins en macronutriments, micronutriments et vitamines doivent être évalués pour les missions spatiales et que des contremesures nutritionnelles doivent être testées.

Dans l'ensemble, les besoins nutritionnels en vol sont basés sur les besoins quotidiens recommandés par l'organisation mondiale de la santé. Ainsi la composition des repas s'articule autour de 15% d'apport protéique, 30% d'apport lipidique et 55% d'apport glucidique sur la base des apports alimentaires de référence (DRI). Pour autant, sur la base des observations de précédents vols et d'études de microgravité simulée, une balance azotée négative a été mise en évidence. En sachant qu'une perte protéique de l'ordre 30% est létale et que toute perte protéique est associée à une réduction des défenses immunitaires et une susceptibilité accrue face aux maladies, il paraît évident que la perte chronique de protéines est une réelle préoccupation. De ce fait, une contremesure nutritionnelle à base d'une supplémentation en protéines a été évaluée pour contrebalancer la perte de masse et de force musculaire observée au cours des vols spatiaux ou au cours d'études d'alimentation prolongé. D'après la revue de Stein et Blanc réalisée en 2011, sur les six études recensées, trois ont mis en évidence des effets bénéfiques de la supplémentation en protéines tandis que trois n'en ont pas montré. De plus, les résultats des études semblent varier en fonction de l'apport en protéines de base [197]. En effet, lorsque l'apport en protéines était inférieur à 0,9g/kg/j, la supplémentation en protéines montrait des effets bénéfiques. Au contraire, lorsque l'apport en protéines était supérieur à 1,2g/kg/j, la supplémentation protéique ne montrait aucun effet bénéfique particulier. Par ailleurs, la supplémentation en protéines semble associée à une acidification du sang due à une augmentation de l'oxydation des acides aminés soufrés, ce qui accélère la perte osseuse [198]. Bien que des recherches dans le domaine soient encore à l'ordre du jour, avec en particulier l'ajout de bicarbonates pour tamponner l'acidification sanguine [199], il apparaît que la supplémentation nutritionnelle à base de protéines ne soit pas la meilleure option pour les missions spatiales de plus longues durées prévues à l'avenir.



d. Les nutriments antioxydants, anti-inflammatoires et avantage d'une approche par cocktail

i. Données issues des études spatiales

De nombreuses publications autour des suppléments nutritionnels sur des populations saines ou au sein de patients atteints de maladies cardiovasculaires, de diabète, de cancer ou de dyslipidémie ont émergé ces dernières années. De même, différentes observations ont été obtenues au cours de missions spatiales chez l'homme et/ou au cours d'étude de microgravité simulée chez l'homme et l'animal, montrant que divers composés bioactifs de l'alimentation pouvaient empêcher l'adaptation de diverses fonctions biologiques à l'espace.

Dans une de leurs publications, l'équipe de Zwart et al. a étudié l'impact d'un apport en oméga-3 sur la perte osseuse à la fois à partir de données issues d'un système de cultures cellulaires modélisant l'apesanteur, sur des données issues d'une étude d'alimentation de 60 jours mais aussi à partir de données d'astronautes en mission à bord de l'ISS entre 4 et 6 mois. Les résultats indiquent premièrement que l'acide eicosapentaénoïque, acide gras insaturé contenu dans les oméga-3, permet de réduire l'activation de la voie de signalisation du NFκB sur des cultures cellulaires soumises à des conditions de microgravité (Figure 17A). Plus encore, au cours d'une étude d'alimentation de 60 jours, les résultats ont démontré une corrélation négative entre la quantité d'acides gras oméga-3 ingérés et le taux du marqueur de résorption osseuse N-télopeptide (NTx) (Figure 17B). Enfin, cette équipe a également observé que la quantité de portions de poissons servies à bord de la station spatiale internationale était positivement associée à une réduction de la perte de densité minérale osseuse (BMD) observée au sein des astronautes au retour de leur mission (Figure 17C). Les données présentées dans cette étude démontrent que les conditions de microgravité induisent une activation de la voie de signalisation NFκB. Plus encore, les données mettent en évidence le fait que l'ingestion d'oméga-3 induit un effet protecteur sur le système osseux via une réduction de l'activation de la voie de signalisation NFκB. Or, la voie de signalisation NFκB est également associée à des événements d'atrophie musculaire en cas de cancer, de septicémie ou encore de diabète et la capacité des oméga-3 à atténuer la perte musculaire dans ces conditions a également été documentée. L'ensemble de ces résultats démontrent que l'inactivation de la voie de signalisation NFκB permettrait de contrer de nombreuses adaptations rencontrées au cours des vols spatiaux au niveau des fonctions osseuses, musculaires et immunitaires et fournit des preuves solides de la probabilité de réussite de son utilisation au cours des missions spatiales. Il est fort possible que quelque chose d'aussi simple que le changement de menu pour augmenter la consommation de poisson puisse servir de contremesure pour aider à atténuer les risques liés au système osseux, musculaire, à la fonction immunitaire et potentiellement même aux radiations [196].

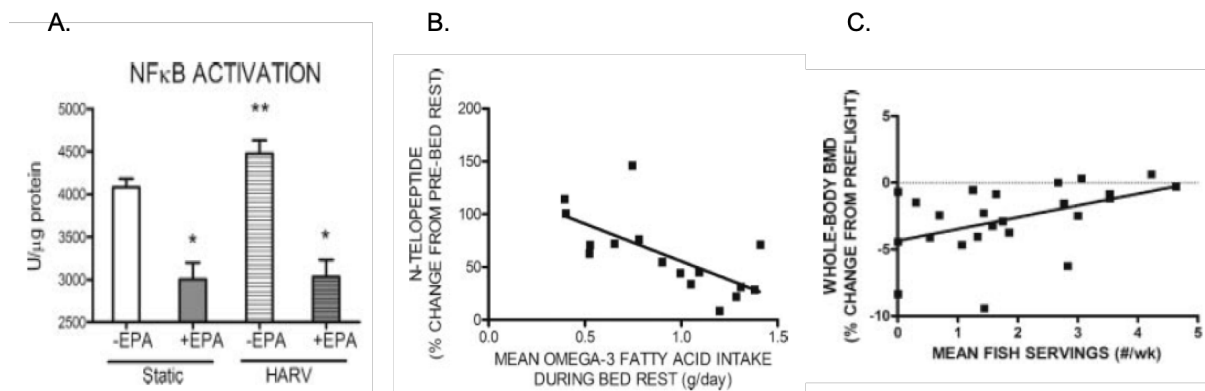


Figure 17 : Impact d'une supplémentation nutritionnelle à base d'acides gras insaturés oméga-3. (Adapté de Zwart et al. 2010).

A. activation de la voie de signalisation NF-KB au sein de cultures cellulaires après 24 heures d'exposition à la microgravité (HARV) ou non (static) avec ou sans incubation avec de l'acide eicosapentaénoïque (EPA).

B. Corrélation entre l'ingestion moyenne d'acides gras riches en oméga-3 et le changement du taux d'excretion du marqueur N-telopeptide suite à un alitement prolongé de 60 jours.

C. Corrélation entre la quantité de portions de poissons servies à bord de la station spatiale internationale et la densité minérale osseuse des astronautes au cours d'une mission spatiale de longue durée.

Par ailleurs, une étude menée par Smith et al. sur une population de sujets âgées et sains a également montré qu'une supplémentation de huit semaines en oméga-3 (à raison de 4g/j) permettait de réduire la résistance anabolique et d'améliorer la sensibilité à l'insuline à travers une voie de signalisation dépendante de mTOR [200]. Une étude s'est également focalisée sur l'effet de la consommation d'huile de poissons (7,2g/j) pendant 28 jours sur l'évolution de la lipogenèse de novo et de la sensibilité à l'insuline après une suralimentation sous forme de fructose. Tandis que la suralimentation en fructose a induit une augmentation de la glycémie à jeun, des taux de triglycérides et une augmentation de la lipogenèse de novo, la supplémentation en huile de poissons a permis de réduire le taux de triglycérides et a également induit une réduction de la lipogenèse de novo. De manière intéressante, les oméga-3 permettraient donc non seulement de prévenir des adaptations musculo-squelettiques et immunitaires mais préviendraient également le développement d'une dyslipidémie sans pour autant protéger contre le développement d'une insulino-résistance [201].

Cependant, d'autres études ont également montré un effet bénéfique de la consommation d'oméga-3 sur la sensibilité à l'insuline chez des patients atteints de stéatose hépatique [202].

Des études se sont également intéressées aux rôles d'une supplémentation en vitamines. Azzi et al. ont d'ores et déjà montré que la vitamine E, plus précisément l' $\alpha$ -tocophérol interviendrait dans la signalisation cellulaire et régulerait l'expression d'un grand nombre de gènes impliquées dans les défenses anti-oxydantes mais également dans la régulation de la protéolyse musculaire [203]. Une étude s'est d'ailleurs intéressée à l'impact d'une supplémentation en vitamine E sur l'atrophie musculaire occasionnée par l'exposition aux conditions microgravitaires au sein d'une population de rats suspendus. Cette étude a montré que le traitement de rats avec de la vitamine E, avant et pendant une suspension de 14 jours a permis d'atténuer l'atrophie au niveau du muscle soléaire. Bien que le traitement en vitamine E n'ait pas permis de réduire l'expression des marqueurs du stress oxydatif, ces résultats suggèrent un mécanisme indépendant de l'action anti-oxydante pour l'action de la vitamine E. Un certain nombre de gènes impliqués dans la protéolyse musculaire ( $\mu$ calpain,

caspase-3, -9, -12) et deux ubiquitines ligases liées à l'atrophie musculaire (MURF1 et atrogine-1) ont été régulées négativement par la vitamine E. Ces résultats constituent un mécanisme de signalisation alternatif permettant de comprendre les effets protecteurs de la vitamine E au niveau musculaire suite à l'exposition à des conditions microgravitaires chez l'animal. L'ensemble de ses résultats témoignent en faveur de l'utilisation de la vitamine E en tant qu'adjuvant pour protéger les cellules musculaires de l'atrophie [205]. D'autre part, la supplémentation intra-gastrique journalière de vitamine E (15mg) sur un modèle de rats suspendus n'a pas permis de prévenir la perte de masse musculaire au sein d'une population de rats suspendus. De plus, la supplémentation en vitamine E a induit une augmentation des concentrations de glutathion disulfure et une diminution du taux de glutathion au sein du muscle squelettique, en comparaison des rats du groupe contrôle. Ces données indiquent donc que la supplémentation en vitamine E a induit un stress oxydant au sein des muscles squelettiques au sein d'un modèle de rats suspendus [206]. Comparé à une autre étude menée sur une population de rats suspendus, la supplémentation avec 15mg de vitamine E était trop importante pour induire une action anti-oxydante. En effet, Kondo et al. avaient administré une dose de 6mg de vitamine E pendant 6 jours d'immobilisation et avaient montré un impact antioxydant de la vitamine E au sein de la population de rats suspendus [207].

Sur la base de ces résultats sur modèle animal, de nouvelles études sur les dosages de vitamine E doivent être effectuées. De plus, de nouvelles études menées sur l'homme suite à une exposition à la microgravité devraient permettre d'évaluer l'efficacité de la vitamine E en tant que contremesure nutritionnelle pour être ensuite implantée au cours des futures missions spatiales.

Des études sur modèle animal en vol ont montré que l'atrophie musculaire était associée à une augmentation de l'ubiquitination des chaînes lourdes de myosine ainsi que l'augmentation de la dégradation de ces mêmes chaînes lourdes de myosine au sein des muscles gastrocnémiens atrophiés [208]. En particulier, il a été montré que deux ubiquitine-ligases étaient impliquées dans l'atrophie musculaire, à savoir l'atrogine-1/MAFbx et MURF1 [209, 210]. Par ailleurs, l'atrophie musculaire est associée à un stress oxydant qui induit une stimulation des ubiquitine-ligases [183, 211]. Ainsi, le stress oxydant peut être un important déclencheur des voies de signalisation conduisant à une atrophie musculaire au cours de longues périodes d'immobilisation [204], d'où l'intérêt d'étudier l'impact de compléments nutritionnels antioxydants. En particulier, les polyphénols, antioxydants naturels, ont démontré leur utilité.

Des études *in vitro* menées sur des myotubes et myoblastes de souris soumis à des conditions microgravitaires ont induit une augmentation de l'expression des ubiquitine-ligases MURF1 et Atrogine-1. Cependant, une supplémentation en épicatechine, épicatechine gallate, epigallocatechine gallate ou quercétine a permis de réduire l'expression des ubiquitine-ligases MURF1 et Atrogine-1 en comparaison du groupe contrôle [204]. Ainsi, cette étude met en évidence que les polyphénols peuvent être une contremesure micronutritionnelle efficace pour lutter contre le stress oxydant, et indirectement sur l'atrophie musculaire induits par des conditions de simulation de microgravité.

Une autre étude *in vitro* a montré qu'une supplémentation en isoflavones permettait d'inhiber la régulation positive de la signalisation inflammatoire médiée par MURF-1 au sein des myotubes. Les auteurs indiquent également que le bénéfice apporté par la supplémentation en isoflavones a impliqué l'activation de SIRT-1, induisant une inhibition de la voie de signalisation NFkB [212]. D'après ces études menées *in vitro*, il semble qu'une supplémentation nutritionnelle à base de polyphénols puisse s'avérer efficace pour lutter contre le stress oxydant et l'atrophie musculaire associée.

Une étude menée par Mukai et al. s'est intéressée à l'impact d'une injection intramusculaire quotidienne de quercétine, composé antioxydant retrouvé dans de nombreuses plantes, au sein de muscle gastrocnémien de souris au cours d'une étude de suspension de 10 jours. Au cours de cette étude, le groupe de souris suspendus sans supplémentation a montré une réduction du rapport poids du muscle gastrocnémien/poids total. De même, la suspension a induit une augmentation de l'expression d'ARNm de l'atrogine-1 et de MURF-1. Enfin, la suspension a induit une élévation des taux de substances réagissant avec l'acide thio-barbiturique, marqueur de l'oxydation des lipides en comparaison du groupe non supplémenté et non suspendu. Au contraire la supplémentation en quercétine a permis de maintenir le ratio poids du muscle gastrocnémien : poids total au cours de l'expérimentation tout en supprimant l'induction d'atrogine-1 et de MURF-1 et en inhibant l'élévation du taux de substances réagissant avec l'acide thio-barbiturique suite aux 10 jours de suspension [213]. Ces résultats démontrent que l'injection intramusculaire de quercétine peut prévenir l'atrophie musculaire induite le modèle de suspension par l'intermédiaire d'une inhibition de l'induction des ubiquitine-ligases atrogin-1 et MURF-1.

Certains isoflavones se sont avérés efficaces mais les résultats les plus probants restent attribués au resvératrol, un isoflavone retrouvé abondamment dans le raisin et le vin rouge [212]. Momken et al. ont testé l'impact d'une supplémentation en resvératrol (400mg/kg/j) sur un modèle de rats suspendus (14 jours). Les résultats de cette étude ont démontré que la supplémentation en resvératrol permettait le maintien de la balance protéique (Figure 18G), de la masse musculaire du muscle soléaire (Figure 18A) ainsi que de la force maximale de contraction du même muscle (figure 18C). La supplémentation en resvératrol a également permis de maintenir la capacité mitochondriale à oxyder le palmitoyl-carnitine (Figure 18E) et a permis de réduire le stress oxydant (Figure 18F) via la réduction d'un biomarqueur du stress oxydant, à savoir le ratio glutathion (GSH) vs glutathion disulfure (GSSG), au sein du muscle soléaire. Au niveau moléculaire, les auteurs rapportent également une préservation du contenu protéique de SIRT-1 (Figure 18D) et de COXIV au sein du muscle soléaire. SIRT-1 est un facteur de transcription qui permet de stimuler la biogénèse mitochondriale, notamment par l'intermédiaire de PGC-1 $\alpha$  tandis que COXIV code pour la sous-unité IV de la cytochrome oxydase et est donc également impliquée dans la biogénèse mitochondriale. Une préservation de ces protéines lors de la suspension permet donc une meilleure biogénèse mitochondriale et garantit ainsi une plus grande absorption et utilisation des substrats énergétiques ainsi qu'une meilleure respiration mitochondriale. Par ailleurs, l'étude révèle également que la supplémentation en resvératrol a permis de préserver la sensibilité à l'insuline (Figure 18H) ainsi que le trafic et l'oxydation des lipides (Figure 18I). Ces derniers résultats sont probablement associés au maintien de l'expression de FAT/CD36, de CPT-1 et de PGC-1 $\alpha$  au niveau musculaire. Enfin, la supplémentation en resvératrol a maintenu la densité minérale osseuse (Figure 18J) et la résistance du fémur au cours de la suspension de 14 jours [214]. L'ensemble de ces résultats indiquent que la simple utilisation du resvératrol en tant que supplémentation nutritionnelle permet de prévenir des adaptations majeures des fonctions physiologiques qui surviennent au cours d'un modèle de simulation de microgravité. Ces résultats encourageants permettent d'envisager l'utilisation du resvératrol comme contremesure nutritionnelle au cours des futures missions spatiales. Pour cela, des études ont testé l'efficacité du resvératrol sur l'Homme mais la revue de littérature de Nouvelle et al. indique que les résultats obtenus chez l'Homme ne sont pas si unanimes [215].

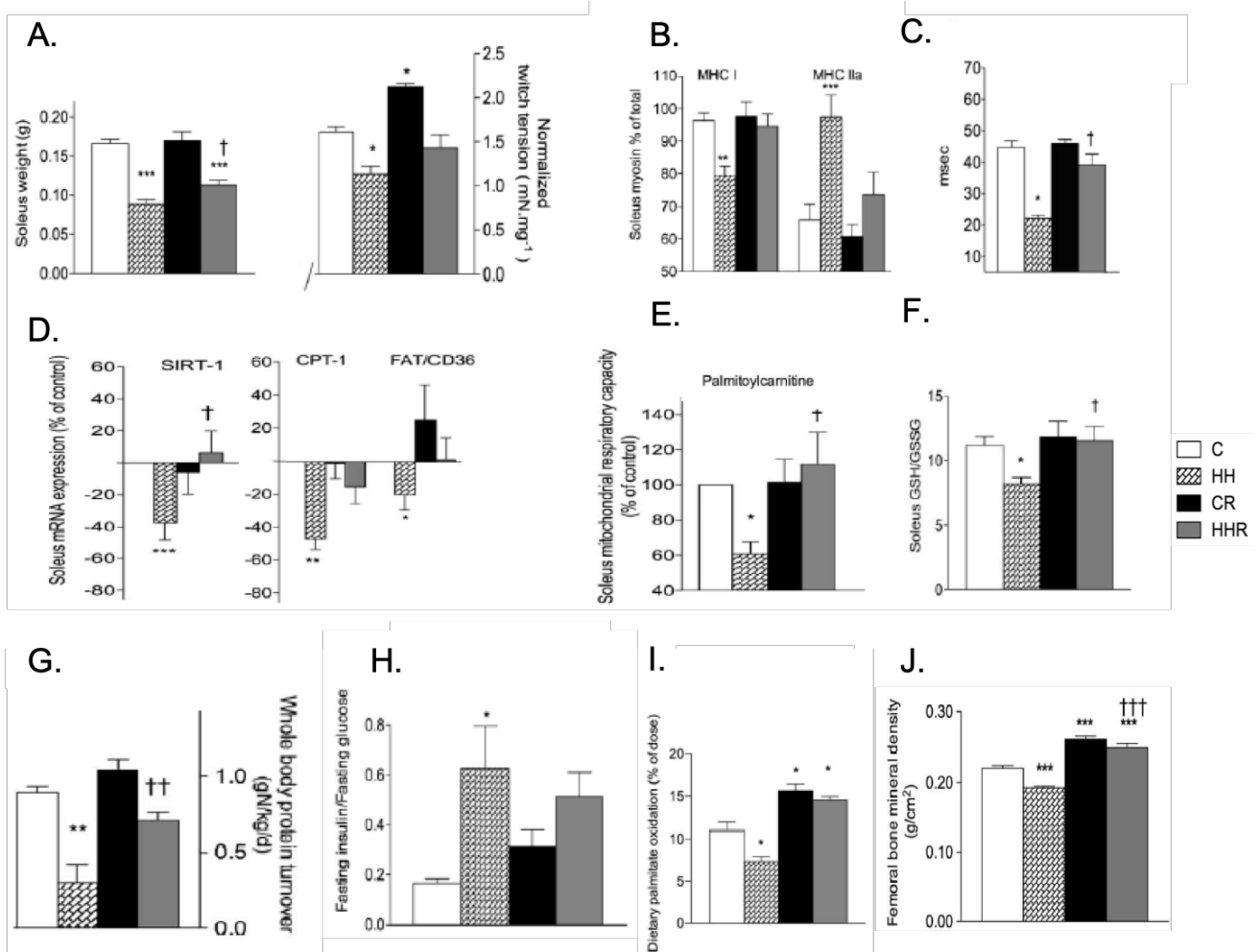


Figure 18 : Impact d'une supplémentation en resvératrol (400mg/kg/j) sur un modèle de rats suspendus pendant 14 jours. (Adapté de Momken et al. 2011)

A. Masse du muscle soléaire B. Pourcentage de chaîne lourde de myosine de type I et IIa au sein de sections transversales de muscle soléaire C. Force maximale de contraction du muscle soléaire D. Contenu protéique de SIRT-1 au sein du muscle soléaire E. Capacité mitochondriale à oxyder le palmitoyl-carnithine F. Ratio GSH/GSSG témoin du stress oxydant au sein du muscle soléaire G. Balance protéique H. Sensibilité à l'insuline I. Oxydation lipidique J. Densité minérale osseuse. C : Groupe Contrôle, HH : Groupe suspendu, CR : Groupe contrôle + Resvératrol, HHR : Groupe suspendu + Resvératrol.

## ii. Données issues de la population générale

Compte tenu des résultats obtenus suite à l'utilisation de divers composés nutritionnels, il apparaît que la consommation de chacun de ces suppléments individuellement permet de prévenir/ réduire certaines altérations engendrées par le déconditionnement spatial, soit sur le système osseux, sur le système musculaire, au niveau métabolique, sans pour autant parvenir à maintenir l'ensemble des fonctions physiologiques. Ces constatations ont permis l'émergence d'un nouveau concept basé sur l'utilisation combinée de différentes sources d'un mélange de molécules et de dérivés naturels sous forme de cocktail nutritionnel. L'action en synergie de différents micronutriments aurait un impact positif et additionnel par rapport à l'usage d'un seul type de supplément nutritionnel avec un impact sur plusieurs systèmes physiologiques. Les composés nutritionnels anti-inflammatoires et antioxydants démontrent un intérêt particulier. En effet, le statut inflammatoire au sein de personnes obèses a été proposé comme une voie de développement de maladies métaboliques et différentes études suggèrent un lien entre l'inflammation et le stress oxydant dans l'athérogenèse [216] ainsi que dans l'obésité et le développement d'une stéatose hépatique [217]. De cette manière, une réduction du statut inflammatoire pourrait prévenir l'apparition de troubles et de maladies liés au surpoids. Or, de nombreux aliments disposent d'actions anti-inflammatoires et anti-oxydantes. À titre d'exemple, le régime méditerranéen s'articule autour de la consommation de nombreux aliments aux propriétés anti-inflammatoires et ce mode de vie est d'ailleurs associé à une réduction de maladies cardiovasculaires et une prévention du diabète de type 2 [218-221]. Sur la base des similitudes entre les études spatiales menées au sein d'une population d'individus sains assujettis à des conditions qui impactent négativement les fonctions physiologiques de l'organisme et les études précliniques et/ou cliniques menées au sein de populations sédentaires en situation pathologique (diabète, obésité, maladies cardiovasculaires) ou non, il est possible de s'appuyer sur les résultats de ce type d'études pour évaluer l'impact des cocktails nutritionnels en vue d'une potentielle application pour les prochaines études spatiales.

Selon la revue de Serrano et al., la flexibilité mitochondriale et métabolique est une caractéristique importante dans le maintien de la vie. Ainsi, les individus métaboliquement flexibles ont la capacité d'oxyder à la fois des glucides et des lipides et d'effectuer une transition dans l'oxydation de ces substrats en réponse au signal hormonal. Au contraire, la plupart des maladies chroniques dégénératives ont en commun une incapacité à s'adapter à l'excès d'énergie disponible. Une atteinte cellulaire au sein du système permettant de réguler l'oxydation des substrats énergétiques est susceptible d'engendrer des effets systémiques sur la santé métabolique d'un individu et donc une inflexibilité métabolique. Par exemple, la résistance à l'insuline est associée à une incapacité à adapter l'oxydation des substrats en fonction de leur disponibilité, ce qui induit une réduction de l'oxydation des glucides suite à une stimulation par l'insuline et en une moindre activation du catabolisme des lipides, entraînant ensuite un stockage ectopique de lipides et une lipotoxicité délétère au signal de l'insuline. Des données mettent en évidence le concept d'altérations mitochondriales pour le développement d'une inflexibilité métabolique par l'intermédiaire d'altérations des fonctions mitochondriales et la génération d'espèces réactives oxygénées. Ainsi, les polyphénols peuvent être utilisés pour cibler les mitochondries et moduler les taux d'espèces réactives oxygénées. Les polyphénols ont diverses actions biologiques en plus de leur action anti-oxydante et bien que les mécanismes d'action ne soient pas clairement identifiés différentes publications ont montré l'intérêt

d'une supplémentation en polyphénols dans la modulation de la flexibilité mitochondriale et métabolique à travers différents modèles d'études (Tableau 2). Ainsi, une supplémentation a permis d'augmenter le nombre de mitochondries au sein du foie et des muscles squelettiques par l'intermédiaire d'une activation de SIRT-1 et PGC1 $\alpha$ . Chez l'Homme, l'ingestion épicatechine à une population de patients atteints de diabète de type II a entraîné une stimulation de de la biogénèse mitochondriale au sein de muscles squelettiques, toujours grâce à l'activation de SIRT-1 et PGC1 $\alpha$ .

Tableau 2: description des effets de composés polyphénoliques sur la flexibilité mitochondriale et métabolique. (Adapté de Serrano et al. 2016)

| Compound                            | Effect  | Mechanism  | Type of Study         |
|-------------------------------------|---|--|-----------------------|
| Resveratrol                         | Increased number of mitochondria in liver and muscle  | SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ activation                              | Animal model          |
| Quercetin                           | Increased mtDNA and cytochrome <i>c</i> content in muscle and brain                                 | SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ activation                              | Animal model          |
| Epicatechin-rich cocoa              | Mitochondrial biogenesis stimulation in muscle  | SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ activation                              | Human study           |
| Coumestrol                          | Increased mitochondrial content in muscle cells   | SIRT1 activation   | Cell culture          |
| Quercetin, kaempferol, epicatechin  | Inhibitors of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> production by mitochondria                              | Inhibition of complex I activity                                 | Cell culture          |
| Grape seed proanthocyanidin extract | Enhanced thermogenic capacity and improvement in mitochondrial function in brown and adipose tissue | Not described  | Animal model          |
| Anthocyanins                        | Complex I activity recovery and increase in the rate of ATP synthesis                               | Functioning as electron carriers in a similar way as coenzyme Q1 | Isolated mitochondria |
| Galangin                            | Modulation of the mitochondrial permeability transition pore  | Decreased fluidity of the mitochondrial membrane                 | Isolated mitochondria |
| Epigallocatechin                    | Modification in mitochondrial architecture  | AMPK $\alpha$ activation   | Animal model          |

Les acides gras poly-insaturés riches en oméga-3 tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) sont également reconnus comme des suppléments nutritionnels qui bénéficient aux patients atteints de diabète de type II. Les effets métaboliques des acides gras riches en oméga-3 résultent de leur interaction avec différents systèmes de l'organisme. Au niveau du foie, des effets hypolipidémiques sont observés dus à la réduction de la lipogenèse, une réduction de la formation de triacylglycérols, une moindre libération des VLDL au sein de la circulation, et une augmentation de l'oxydation des acides gras. De même, les acides gras riches en oméga-3 sont également susceptibles d'induire un changement dans l'oxydation des substrats énergétiques vers l'augmentation de l'oxydation des lipides et une réduction de l'oxydation des glucides. Enfin, ils semblent également affectés le développement du tissu adipeux, son métabolisme ainsi que ses sécrétions. Ainsi, une revue non exhaustive d'études ayant montré des effets d'une supplémentation en oméga-3 sur les réactions métaboliques et les fonctions mitochondriales est présentée en Tableau 3.

Tableau 3: description des effets d'une supplémentation en acides gras riches en oméga-3 sur le métabolisme et les fonctions mitochondriales (Adapté de Serrano et al. 2016)

| Product     | Effect   | Mechanism  | Type of Study        |
|-------------|--|--|----------------------|
| Fish oil    | Improvement in mitochondrial efficiency                    | Increased content or enhanced kinetics of ETC  | Animal model         |
| Fish oil    | Reduced body fat mass                                      | Stimulation of lipid oxidation   | Human study          |
| Fish oil    | Decrease in insulinemia                                    | Increased lipid oxidation  | Human study          |
| DHA + EPA   | Improve in mitochondrial ADP kinetics                      | Incorporation in mitochondrial membranes, displacing $\omega$ -6 species in several phospholipids population | Human study          |
| DHA + EPA   | Decrease in H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> production       | Increased tolerance to Ca <sup>2+</sup> -induced MPTP opening  | Isolated mitochondri |
| Fish oil    | Improvement in ATP production in brain                     | Improvement in membrane fluidity   | Animal model         |
| EPA and DHA | Increase in ATP and reduction in ROS levels in hepatocytes | Increase in the length of mitochondrial tubes by an increase in Mfn2 mRNA levels                             | Cell culture         |
| EPA         | Restoration of skeletal muscle mitochondrial capacity      | Increase in coupling efficiency of the ETC   | Animal model         |



Il existe donc de nombreuses publications mettant en évidence des effets positifs de différents polyphénols (resvératrol, quercétine) et d'acides gras riches en oméga-3 pour prévenir/réduire les situations d'inflexibilité métabolique. Bien que les mécanismes ne soient pas clairement identifiés, une interaction indirecte avec le métabolisme mitochondrial est suggérée.

En matière d'études précliniques, une étude s'est intéressée à l'impact d'un cocktail antioxydant sur des rats atteints du syndrome d'absence de sensibilisation à l'insuline induite par les repas (AMIS). Ce syndrome survient avec l'âge et est caractérisé par une hyperglycémie, une hyperinsulinémie, une hyperlipidémie, une augmentation du stress oxydant, et une obésité, le tout évoluant vers le développement d'un diabète. De plus, la consommation de saccharose potentialise les effets négatifs de ce syndrome. Lauth et al. ainsi que différentes études (revue de Wang et al.) ont affirmé que la consommation d'un cocktail antioxydant composé de S-adénosyl-méthionine, de vitamine C et de vitamine E (SAMEC) permettait de protéger contre le développement de l'AMIS avec le temps et inhibait complètement les effets négatifs du saccharose sur le développement de l'AMIS [222, 223]. L'utilisation synergique de composés nutritionnels montrent un impact positif sur différents systèmes au sein du modèle animal. Chez l'Homme, une approche par cocktail à base de polyphénols (2g/j pendant 8 semaines) a montré une réduction du stress oxydant et une préservation de la sensibilité à l'insuline suite à une période de suralimentation sous forme de fructose au sein d'une population d'individus obèses [224]. Plus encore, l'impact de suppléments nutritionnels sous forme de cocktail a déjà été testé et a démontré des effets bénéfiques au niveau du stress oxydant et de l'inflammation au sein d'une population d'individus en surpoids atteints de diabète de type 2 [225]. Au cours de cette dernière, 36 individus souffrant d'obésité se sont vus administrer un traitement de cinq semaines à base de resvératrol, vitamine E, vitamine C, acides gras sous forme d'oméga-3 ainsi que des extraits de tomates. Les résultats de l'étude indiquaient une réduction du stress oxydant et de l'inflammation, notamment au niveau du tissu adipeux ainsi qu'une augmentation de l'oxydation lipidique au niveau du foie et une réduction de la synthèse de triglycérides.

Une autre étude s'est également focalisée sur l'impact d'une supplémentation en antioxydants sur le stress oxydant, l'inflammation et les fonctions hépatiques chez des enfants et des adolescents en surpoids ou obèses. Le cocktail antioxydant utilisé lors de l'étude publiée par Murer et al. consistait en l'ingestion quotidienne de vitamine C (500mg /j), vitamine E (400IU/j) et de sélénium (50µg/j) sur une période de quatre mois. À la suite de l'étude, il apparaît que le cocktail a été bien toléré au cours des quatre mois d'ingestion et a permis de réduire le stress oxydant. Les résultats indiquent également un possible ralentissement de la progression de troubles hépatiques observés à partir de l'évolution des aminotransférases (ALT et AST). Par contre, la supplémentation en antioxydants n'est pas parvenue à réduire l'inflammation systémique chez les enfants et les adolescents obèses ou obèses [217]. De manière intéressante, cette étude a permis d'obtenir des résultats encourageants via la consommation d'un cocktail d'antioxydants tandis que des études similaires évaluant l'impact de chacun des composés individuellement n'avaient pas permis de tirer des conclusions sur l'intérêt de tels composés sur les mêmes fonctions physiologiques.

Plus encore, une étude récente s'est intéressée à l'impact d'une co-supplémentation en oméga-3 (1000mg/j) et en vitamine E (400 UI/j) au cours d'une période de 12 semaines chez des patientes atteintes du syndrome des ovaires polykystiques. Cette population est également intéressante car des études rapportent que 50% de femmes atteintes de ce syndrome sont également insulino-résistantes et qu'elles sont d'autant plus à risque de développer un diabète de type II. À la suite des 12 semaines

d'intervention, la co-supplémentation en oméga-3 et vitamine E a permis de réduire différents index d'évaluation de résistance à l'insuline et d'augmenter un index de sensibilité à l'insuline. Les mécanismes par lesquels les oméga-3 et la vitamine E peuvent influencer les marqueurs du métabolisme de l'insuline restent inconnus. Toutefois les auteurs formulent une hypothèse impliquant une élévation de la concentration de l'adiponectine permettant d'améliorer la sensibilité à l'insuline. Au sein du muscle, l'adiponectine stimulerait l'AMPK, ce qui permettrait ensuite de stimuler les voies de signalisation pro-oxydatives. Par ailleurs, les auteurs précisent que l'action de la vitamine E impliquerait l'inhibition de la voie de signalisation NFkB, comme cela avait déjà été documenté [226]. Cette étude ajoute de nouveaux arguments en faveur de l'utilisation combinée d'oméga-3 et de vitamine E en tant que contremesure nutritionnelle.

Une étude s'est également intéressée à l'impact d'une co-supplémentation en resvératrol et en quercétine pour contrer le stress oxydant et l'inflammation en réponse à l'exercice physique. Dans une étude croisée, 14 athlètes ont ingéré un placebo ou 120mg de resvératrol et 225mg de quercétine pendant 6 jours et 240mg de resvératrol et 450mg de quercétine juste avant la pratique d'un exercice physique qui consistait à courir une heure de course sur tapis roulant à environ 80% de la VO<sub>2</sub>max des participants. Les résultats indiquent que la co-supplémentation en resvératrol et en quercétine a atténué la peroxydation lipidique suscitée par l'exercice physique. Cependant la supplémentation n'a pas permis de contrebalancer l'inflammation et le statut antioxydant plasmatique suite à l'exercice physique. Ces résultats indiquent que le resvératrol et la quercétine, antioxydants naturels ne fonctionnent pas in vivo comme pourrait le faire d'autres composés antioxydants malgré leur haute capacité anti-oxydante. Cette étude suggère donc que d'autres mécanismes sont impliqués dans la réduction du stress oxydant [227].

Auparavant, les contremesures étaient développées pour cibler une à deux adaptations engendrées par la microgravité ; aujourd'hui il semble primordial d'évaluer la réponse de l'ensemble des organes afin de comprendre et mettre en évidence d'éventuelles conséquences non désirées au sein d'organes non ciblés par les contremesures. En vue de l'exploration spatiale vers Mars, la pensée se doit d'être intégrative et holistique. Pour cela, il convient de développer des contremesures qui permettent de protéger l'intégralité des fonctions physiologiques de l'organisme. De plus, l'impact de différentes contremesures combinées dans le but de mettre en évidence des effets synergiques et antagonistes doivent être le fruit des futurs travaux dans ce domaine. Il est très probable que l'exercice physique constitue la base du programme de contremesures et qu'il pourrait être complété par d'autres contremesures qu'il reste encore à déterminer, mais qui pourraient inclure des aides gravitationnelles et/ou compressives, immunitaires, psychologiques, des produits pharmacologiques, tout comme des suppléments nutritionnels [20]. Sur le plan de la nutrition, des preuves venant de nombreuses publications portant sur des modèles animaux, des données épidémiologiques, ou des essais cliniques démontrent qu'au-delà du maintien de la balance énergétique et de la composition en macronutriments, l'apport d'éléments nutritionnels spécifiques peut être bénéfique. Bien que les mécanismes ne soient pas encore clairement établis de nouvelles études impliquant l'utilisation combinée de contremesures nutritionnelles sous forme de cocktail doivent permettre d'obtenir de nouvelles informations en vue de garantir l'utilisation de telles contremesures lors des futures missions spatiales de longue durée, et plus particulièrement pour l'exploration humaine vers Mars prévue à l'horizon 2020-2030. Au cours de ce projet de thèse, l'intérêt a été porté sur l'impact d'une contremesure anti-oxydante et anti-inflammatoire basée sur un cocktail de polyphénols ainsi qu'une supplémentation en oméga-3, en vitamine E et en sélénium.

# Objectifs & Hypothèses

## a. Objectifs généraux

L'objectif fondamental de ce travail de thèse consiste à mettre en évidence les mécanismes qui permettent d'expliquer l'hypothèse de l'adaptation métabolique qui s'établit au cours d'un alitement prolongé. En lien avec la cascade d'événements précédemment proposée par notre équipe de recherche, cette thèse a pour objectif principal de caractériser l'état d'inflexibilité métabolique induit par le modèle de simulation de microgravité qu'est l'alitement prolongé. Un autre objectif, plus applicatif, consiste à faire progresser nos connaissances dans la mise au point de contremesures. Cette thèse a pour but de démontrer l'impact d'une contremesure nutritionnelle sous forme de cocktail composé d'antioxydants et d'anti-inflammatoires pour prévenir/réduire le déconditionnement métabolique engendré par une étude d'alitement prolongé de 60 jours. Toutefois, compte tenu des très larges coûts engagés dans les études d'alitement prolongé, le cocktail nutritionnel a fait l'objet d'une étude de faisabilité chez l'Homme en condition de vie libre avant d'être utilisé au cours de l'étude clinique principale du projet de thèse.

Le premier chapitre est dédié à une étude de faisabilité menée en 2015. Les adaptations métaboliques et fonctionnelles engendrées par l'inactivité physique et la supplémentation nutritionnelle sous forme de cocktail d'antioxydants et d'anti-inflammatoires ont été testées au cours d'un protocole de sédentarisation de 20 jours sur une population d'hommes actifs en condition de vie libre. Cette étude pilote a permis de valider l'utilisation du cocktail nutritionnel comme contremesure lors de l'étude d'alitement prolongé de 60 jours qui s'est tenu au cours de l'année 2017.

À ce titre, le second chapitre de cette thèse porte sur l'impact de 60 jours de microgravité simulée sur le métabolisme lipidique, la sensibilité à l'insuline, l'inflammation, le stress oxydant et la flexibilité métabolique et le stockage ectopique. En parallèle, la contremesure nutritionnelle sous forme de cocktail a été évaluée dans le but de prévenir/réduire les troubles métaboliques engendrés par l'alitement.

## b. Hypothèses

L'ensemble des travaux de recherche entrepris au cours de ce travail de thèse cherche à déterminer si les résultats suivent l'hypothèse d'un impact négatif de l'inactivité physique sévère engendrée par la microgravité sur le métabolisme lipidique, l'inflammation, la sensibilité à l'insuline et le développement d'une inflexibilité métabolique et le stockage ectopique des graisses.

Le premier chapitre a pour but de tester l'hypothèse selon laquelle l'induction d'une période d'inactivité physique couplée à une surnutrition glucidique sous forme de fructose chez des individus sportifs a pour conséquence une détérioration métabolique et fonctionnelle de l'organisme qui se manifeste par une réduction de la sensibilité à l'insuline / le développement d'une insulino-résistance, un stockage ectopique de lipides au niveau du foie, la stimulation de la lipogenèse *de novo*, une atrophie musculaire ainsi qu'une augmentation de l'inflammation et du stress oxydant. L'ensemble de ces atteintes a pour conséquence le développement d'une inflexibilité métabolique. Nous émettons également l'hypothèse que la supplémentation nutritionnelle en antioxydants et anti-inflammatoires

permettra de prévenir l'ensemble des adaptations engendrées par la sédentarisation et la surnutrition glucidique.

Le second chapitre entreprend de tester l'hypothèse selon laquelle l'alitement prolongé de 60 jours induit une réduction de la sensibilité à l'insuline. Nous émettons également l'hypothèse que l'alitement entraîne une réduction de la capacité à oxyder des lipides tout en augmentant l'oxydation glucidique à jeun et en situation postprandiale. Ce changement d'oxydation des substrats énergétiques aurait pour conséquence une augmentation du relargage des lipides d'origine alimentaire dans la circulation plasmatique. Ces adaptations engendreraient une hypertriglycémie ainsi qu'un stockage ectopique de lipides au niveau musculaire et hépatique. Nous supposons que l'alitement prolongé aura également une incidence sur le développement de l'inflammation et du stress oxydant. Nous prévoyons également que l'ensemble de ces adaptations induit le développement d'une inflexibilité métabolique mise en évidence grâce à un challenge métabolique sous forme de surnutrition glucidique.

En parallèle, l'hypothèse que la contremesure anti-oxydante et anti-inflammatoire sous forme de cocktail permette de prévenir/réduire l'ensemble des adaptations induites par l'alitement prolongé de 60 jours est également posée.

## **Pilot study: a nutrient cocktail prevents lipid metabolism alterations induced by 20 days of daily steps reduction and fructose overfeeding: Result from a randomized study**

### a. Resume

Microgravity imposes physical inactivity and muscle disuse, which led to the development of metabolic alterations including the development of insulin resistance, an inability to burn fat as fuel, hypertriglyceridemia, metabolic inflexibility. We believe altogether these changes are leading to the storage of ectopic fat, which exacerbates the development of insulin resistance at the peripheral tissue level and at the whole-body level. Many countermeasures have been used to prevent / reduce inactivity adaptations, but not all have been effective. In recent years, numerous studies have shown that omega-3 fatty acids supplementation, vitamins and micronutrients help to reduce the effects of spatial deconditioning on bones, with a reduction in loss of mineral bone density loss, better protein synthesis and bone maintenance or insulin sensitivity for example. However, it does not appear that the consumption of any of the micronutrients proposed may be sufficiently powerful to counterbalance the deleterious effects of physical inactivity. For this reason, the concept of nutritional cocktail is interesting and recent data show that the combined consumption of nutritional supplements would induce synergistic effects to trigger positive metabolic responses. While these micronutrients would reduce the risk of developing metabolic disease, no study in the literature reports their impact on metabolic alterations caused by physical inactivity. For this reason, we proposed the use of a new cocktail of antioxidants and anti-inflammatories, composed of polyphenols, omega-3, vitamin E and selenium. The best way to reproduce the physiological adaptations that astronauts experience in space on Earth and to test countermeasures is to use the bed-rest model paradigm. However, these experiments have a very large cost and requires a complex logistic. Other physical inactivity paradigms exist, such as the reduction of daily steps in physically active participants. In this study, we tested the ability of the cocktail to prevent metabolic alterations caused by a sedentarization protocol on twenty healthy trained men randomly divided into a control group (no supplementation) and a cocktail group. During twenty days of enforced physical inactivity along with fructose overfeeding during the last ten days. Fructose overfeeding was used to potentiate the metabolic alterations induced by physical inactivity.

Despite cocktail consumption did not prevent the decrease in insulin sensitivity during sedentarization, nutritional supplementation completely prevented the development of hypertriglyceridemia as the drop in fasting HDL and the increase in *de novo* lipogenesis. In addition, the cocktail prevented the decrease in muscle fibers cross sectional area associated with a lower ubiquitination content. Moreover, the cocktail supplementation also improved the anti-oxidant capacity following OGTT.

In conclusion, it appears that the consumption of this nutrient cocktail composed of antioxidants and anti-inflammatories protects the lipid metabolism alterations induced by physical inactivity and fructose overfeeding.



## **A nutrient cocktail prevents lipid metabolism alterations induced by 20 days of daily steps reduction and fructose overfeeding: Result from a randomized study**

### **Authors' names and affiliations :**

Anthony Damiot<sup>1</sup>, Rémi Demangel<sup>2</sup>, John Noone<sup>3</sup>, Isabelle Chery<sup>1</sup>, Alexandre Zahariev<sup>1</sup>, Sylvie Normand<sup>4</sup>, Thomas Brioché<sup>2</sup>, François Crampes<sup>5,6</sup>, Isabelle de Glisezinski<sup>7</sup>, Etienne Lefai<sup>4</sup>, Marie Pierre Bareille<sup>8</sup>, Angèle Chopard<sup>2</sup>, Jocelyne Draï<sup>4,9</sup>, Delphine Collin-Chavagnac<sup>4,9</sup>, Martina Heer<sup>10</sup>, Guillemette Gauquelin-Koch<sup>11</sup>, Michel Prost<sup>12</sup>, Patrick Simon<sup>13</sup>, Guillaume Py<sup>2</sup>, Stéphane Blanc<sup>1\*</sup>, Chantal Simon<sup>4\*</sup>, Audrey Bergouignan<sup>1,14,15\*</sup>, Donal J. O'Gorman<sup>3,16\*</sup>

\* These authors contributed equally to the work.

<sup>1</sup> Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France

<sup>2</sup> Université de Montpellier, INRA, UMR866 34060, Dynamique Musculaire et Métabolisme, F-34060, Montpellier, France

<sup>3</sup> National Institute for Cellular Biotechnology & School of Health and Human Performance, Dublin City University, Ireland

<sup>4</sup> CARMEN, INSERM U1060/University of Lyon 1/INRA U1235; CRNH-RA Lyon, France

<sup>5</sup> INSERM, UMR 1048, Obesity Research Laboratory, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France

<sup>6</sup> Paul Sabatier University, Toulouse, France

<sup>7</sup> INSERM, UMR1048, Obesity Research Laboratory, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases and University of Toulouse, Paul Sabatier University and Toulouse University Hospitals, Departments of Clinical Biochemistry and Sports Medicine, Toulouse, France

<sup>8</sup> MEDES, Institut de Médecine et de Physiologie Spatiales, 31400, Toulouse, France

<sup>9</sup> Laboratoire de Biochimie CHLS 69310 Pierre Bénite, France

<sup>10</sup> Institute of Nutritional and Food Sciences, University of Bonn, Bonn, Germany

<sup>11</sup> CNES, 75001 Paris, France

<sup>12</sup> Laboratoire de recherches appliquées Spiral/Kirial International, 21560 Couternon, France

<sup>13</sup> Hôpital St-Joseph St-Luc, 69007 Lyon, France

<sup>14</sup> Anschutz Health and Wellness Center, Anschutz Medical Campus, Aurora, Colorado, USA.

<sup>15</sup> Division of Endocrinology, Metabolism and Diabetes, University of Colorado, Anschutz Medical Campus, Aurora, Colorado, USA.

<sup>16</sup> 3U Diabetes Consortium, Dublin City University, Ireland.

**Running Head:** Nutrient cocktail protects against physical inactivity

### **Corresponding author:**

Stéphane Blanc

IPHC-DEPE

Centre National de la Recherche scientifique,

23 rue Becquerel



67087 Strasbourg, France.

Tel: +33 609121847

E-mail : [stephane.blanc@iphc.cnrs.fr](mailto:stephane.blanc@iphc.cnrs.fr)

Article published in Journal of Applied Physiology :

[A nutrient cocktail prevents lipid metabolism alterations induced by 20 days of daily steps reduction and fructose overfeeding: Result from a randomized study.](#)

**Damiot A**, Demangel R, Noone J, Chery I, Zahariev A, Normand S, Brioché T, Crampes F, de Glisezinski I, Lefai E, Bareille MP, Chopard A, Draï J, Collin-Chavagnac D, Heer M, Gauquelin-Koch G, Prost M, Simon P, Py G, Blanc S, Simon C, Bergouignan A, O'Gorman DJ.

J Appl Physiol (1985). 2018 Oct 4. doi: 10.1152/jappphysiol.00018.2018. [Epub ahead of print]

PMID: 30284519

## ABSTRACT

**Context:** Physical inactivity and sedentary behaviours are independent risk factors for numerous diseases.

**Objective:** We examined the impact of a nutrient cocktail composed of polyphenols, omega-3 fatty acids, vitamin E and selenium to prevent the expected metabolic alterations induced by physical inactivity and sedentary behaviors.

**Design/Setting/Participants:** Twenty healthy trained men (averaging~14,000 steps/d and engaged in sports) were randomly divided into a control group (no supplementation) and a cocktail group for a 20-day free-living intervention during which they stopped exercise and decreased their daily steps to averaging~3000. During the last 10 days, metabolic changes were further triggered by fructose overfeeding. On days 0, 10 and 20, body composition (DXA), blood chemistry, glucose tolerance (OGTT) and substrate oxidation (indirect calorimetry) were measured. Glucose tolerance included 1% fructose labelled with (U-<sup>13</sup>C) fructose to assess liver *de novo* lipogenesis. Histological changes and related cellular markers were assessed from muscle biopsies collected on days 0 and 20.

**Results:** While the cocktail did not prevent the decrease in insulin sensitivity and its muscular correlates induced by the intervention, it fully prevented the hypertriglyceridemia, the drop in fasting HDL and total fat oxidation, and the increase in *de novo* lipogenesis. The cocktail further prevented the decrease in type-IIa muscle fiber cross-sectional area and was associated with lower protein ubiquitination content. The circulating anti-oxidant capacity was improved by the cocktail following the OGTT.

**Conclusion:** A cocktail of nutrient compounds from dietary origin protects against the alterations in lipid metabolism induced by physical inactivity and fructose overfeeding.

**New & Noteworthy:**

This is the first study to test the efficacy of a novel dietary nutrient cocktail on the metabolic and physiological changes occurring during 20 days of physical inactivity with fructose overfeeding.

The main findings of this study are that (i) reduction in daily steps leads to decreased insulin sensitivity and total fat oxidation, resulting in hyperlipemia and increased de novo lipogenesis; and (ii) a cocktail supplement prevents the alterations on lipid metabolism.

**Keywords:** nutrition; physical inactivity; sedentary behaviors; countermeasure; polyphenols; omega-3 fatty acids; selenium; vitamins; OGTT

**Abbreviations:**

Akt: Protein kinase B

AUC: Area under the curve

BSA: Bovine serum albumine

CSA: Cross sectional area

CPT1: Carnitine palmitoyl transferase 1

DHA: Docosahexaenoic acid

DRI: Dietary references intake

DXA: Dual energy X-ray

EPA: Eicosapentaenoic acid

FABPpm: Fatty acid binding protein plasma membrane

FAT/CD 36: Fatty acid transport CD36

FATP1: Fatty acid transport protein 1

FM: Fat mass

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GSH: Glutathione

GSK3: Glycogen synthase kinase 3

GSSG: Glutathione disulfide

HDL: High density lipoprotein

HMW: High molecular weight

HPLC: High performance liquid chromatography

IRMS: Isotope ratio mass spectrometry

LBM: Lean body mass

LCcoA: Long chain acyl co-A

LPL: Lipoprotein lipase

MDA: Malondialdehyde

MET: Metabolic equivalent

MPE: Molar percent enrichment

mtGPAT: mitochondrial glycerol-3phosphate acyltransferase

NEFA: Non-esterified fatty acids

NFkB: Nuclear factor kappa beta

NPRQ: non-protein respiratory quotient

OGTT: Oral glucose tolerance test

PBS: Phosphate buffered saline

PGC1 $\alpha$ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha

ROS: Reactive oxygen species

TG: Triglycerides

UL: Upper limit

VL: Vastus lateralis

VLDL: Very low-density lipoprotein

$\omega$ -3: Omega-3 fatty acids

## INTRODUCTION

Over the past decade, physical inactivity has emerged as an important risk factor for a number of chronic metabolic and cardiovascular diseases. In addition, sedentary behaviors have been associated with adverse health effects [228] even in subjects who meet the levels of current recommendations on physical exercise [229]. This *sedentary death syndrome* [230] is responsible for an equivalent number of deaths to smoking [231] and has prompted numerous research studies to understand the role of physical inactivity and sedentary behaviors in diseases aetiology and develop efficient preventive strategies.

Research on the physiology of physical inactivity in humans has been pioneered by researchers investigating physiological adaptations of astronauts to space environment. To do so, they used a ground-based model analogue to microgravity, the bed-rest model [9]. Indeed, the hypokinesia and hypodynamia induced during prolonged bed-rest are largely responsible for the described adaptations to space. Over the past 60 years, bed-rest studies ranging from as little as 3 days to 120 days have demonstrated that physical inactivity leads to muscle atrophy and a shift from slow oxidative fibers towards fast glycolytic fibers [232]. These structural adaptations are strongly associated with the development of metabolic inflexibility, low-grade inflammation and oxidative stress [233-235]. There is an increase in fasting and post-prandial glucose oxidation concomitant to an increased spillover of dietary lipids along with a reduced capacity to burn fat (see [115] for review). The resultant hypertriglyceridemia leads to ectopic fat storage in the liver, muscle and bone marrow [162] and contributes to the development of insulin resistance at the muscle level [115]. The role of physical inactivity and sedentary behaviors in the onset and progression of metabolic diseases have attracted an increasing attention from the scientific biomedical community over the past decade. Some investigators have proposed to reduce the number of daily steps of physically active individuals to study the direct metabolic effects of physical inactivity [236-238]. While these studies confirmed the findings observed during the bed rest studies at levels of physical inactivity closer to what is observed in the general population, they did not examine the underlying mechanisms. The physiology of physical inactivity therefore needs to be further delineated in order to develop strategies to prevent its deleterious effects.

Recent studies conducted to develop preventive strategies suggest that bioactive nutrients such as polyphenols, vitamins and essential fatty acids may mitigate some metabolic features of physical inactivity. However so far, most studies have been tested in rodent analogs of microgravity to induce muscle disuse atrophy and metabolic disorders. A large body of data exists in human, rodents and primates demonstrating the effect of polyphenols such as quercetin, resveratrol, cinnamon, grape or green tea extracts on insulin sensitivity, lipid metabolism, inflammation and oxidative stress (see [239-246] for recent reviews). In addition, polyphenols supplemented as pure molecules such as 8-phenylnaringenin (flavanones, [247]), quercetin, (flavonols, [248]), resveratrol (oligostilbens, [214]), epigallocatechin 3 (catechins, [249]) or as extracts from dietary sources (green tea, apple extracts or grape seed extracts) prevent several aspects of rodent muscle atrophy and metabolic disorders induced by disuse while some promote a fatigue resistant muscle fiber phenotype [249-253].

Vitamin E is also known to have anti-oxidant capabilities, by acting as a reactive oxygen species (ROS) scavenger, and anti-inflammatory properties through inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway, which is well described in disuse atrophy models to activate proteolytic pathways [254, 255]. Vitamin E supplementation mitigates disuse atrophy in rats [205], reduces adipose tissue fibrosis, inflammation, oxidative stress and blood lipids in obese humans [256]. Vitamin E intake is also related to muscle strength in the elderly [257, 258]. Selenium is often co-supplemented with vitamin E as it scavenges ROS and boosts the intracellular effects of vitamin E. The combination of these two micronutrients was also shown to be beneficial on specific dystrophy [259]. Furthermore, selenium has independent effects on insulin sensitivity and reduces insulin secretion [260]. Although these effects are still debated there are clear anti-oxidant and anti-inflammatory effects of selenium [261], but not on lipid metabolism [260].

The role of omega 3 fatty acids ( $\omega$ -3) has been studied for decades. Studies in healthy and unhealthy humans and animals showed that they improve hepatic insulin sensitivity, lower very-low-density lipoproteins (VLDL) production and *de novo* lipogenesis by the liver, and reduce inflammation and oxidative stress [262-264]. All of these are metabolic features observed in the inactive/sedentary states [115]. These observations were also reported in presence of fructose overfeeding [201]. Surprisingly, besides the protective effects of  $\omega$ -3 supplementation during bed-rest and spaceflight on bone markers [196], no studies have investigated their impact on muscle function during disuse. However, some studies suggest they could have beneficial effects to prevent against muscle atrophy. In rodent cancer-induced cachexia,  $\omega$ -3 fatty acids supplementation prevented muscle atrophy [265] and in the elderly, they also increased activation of the protein synthesis mTOR pathway in response to insulin stimulation in the elderly [200, 266].

While the available literature suggests that some bio-active molecules, taken individually or as food extracts, improve several aspects of muscle and whole-body metabolic control, it is unlikely that any single micronutrient will be sufficiently powerful to reverse the wide range of deleterious effects induced by physical inactivity. Recently the notion of nutrient cocktails, to trigger additive and/or synergistic effects between bio-active compounds, has been proposed [225]. Several studies have shown that co-supplementing with  $\omega$ -3 & green tea extracts [267],  $\omega$ -3 & vitamin E [226, 268], vitamin E & selenium [269], fish oil & selenium [270], epigallocatechin & resveratrol [271] improve, to some extent, insulin sensitivity, body composition, fat oxidation, inflammation and oxidative stress in aging and diseases associated with muscle atrophy including obesity and type 2 diabetes.

While these cocktails have the potential to reduce the risk of metabolic disease there are no studies in the literature examining their impact on physical inactivity-induced metabolic alterations in humans. The purpose of this study was to determine the preventive effect of a nutrient cocktail composed of polyphenols,  $\omega$ -3, vitamin E and selenium on the metabolic and physiological changes that occur during 20 days of reduced daily steps and exercise in trained men. To further trigger metabolic deterioration, dietary fructose supplementation was provided during the last 10 days of the trial. We hypothesized that the cocktail supplementation would reduce and/or prevent the deterioration in glucose and lipid metabolism, insulin sensitivity and muscle atrophy that are associated with reduced physical activity and fructose overfeeding.

## METHODS

### *Subjects*

Twenty healthy trained young men were recruited from the local community. Characteristics are presented in **Table 1**. Habitual physical activity was assessed using hip-worn triaxial accelerometry (Actigraph GT3x+™, Actigraph USA) for 7 days. Subjects were included if they walk >10,000 steps/day, participated in at least two leisure sport sessions per week and were free of any known diseases. Subjects were excluded if not able to drastically reduce professional, leisure and transport-related physical activities. This study was approved by the local ethical committee and all subjects provided written informed consent (NCT03313869, ID-RCB number: 2015-A00665-14).

### **Experimental design**

The experiment outflow is presented in **Figure 1**. Participants were randomly assigned to control (n=10) or daily nutrient cocktail supplemented (n=10) groups. Random tables were generated by the study statistician. The participants, nurses and physicians were not blinded as no placebo pills were given to the control group; however, the statistician was blinded. During the 20-day study in free-living conditions, volunteers from both groups were asked to stop exercising and drastically reduce their daily physical activity. Subjects were instructed to walk a maximum of 2,500-4,000 steps/day. This was controlled on a daily basis by the subject and the investigators through a wrist-worn Fitbit pedometer (Fitbit, USA). Accurate data were assessed using an Actigraph GT3x+™ hip-worn throughout the twenty days of the experiment. Metabolic stress induced by physical inactivity was boosted during the last ten days of the protocol by ingesting 3g/kg/d of fructose (Vivis® fructose) mixed with 0.5g/kg/d glucose in water to alleviate intestinal problems [272, 273], on top of their regular diet. Fasting blood collection, glucose tolerance, substrate oxidation and *de novo* lipogenesis were measured at baseline and after 10 and 20 days of reduced activity. Muscle biopsies and body composition measurements were completed at baseline and after 20 days (**Figure 1**). Diet was not controlled during the intervention; subjects were instructed to eat according to their appetite.

### **Cocktail composition and doses**

The supplemented group received a polyphenol nutrient cocktail derived from food sources that consist of Liliaceae, Vernenaceae, Lamiaceae, Vitaceae, Rubiaceae, Theaceae and Rutaceae Genres consisting of *Allium cepa*, *Lippia citriodora*, *Ajuga reptans*, *Vitis vinifera*, *Coffea robusta*, *Camellia sinensis*, and *Citrus aurantium*. The cocktail is referred to as XXS-2A and was designed by Spiral Company (Dijon, France). The daily dose was achieved by the ingestion of 3 pills (one at breakfast, lunch and dinner) to reach a total dose of 529.5 mg/d of polyphenols that was composed of 120 mg/d flavonols (including quercetin 50 mg), 75 mg/d oligostilbens (including resveratrol 20 mg), 91.5 mg/d hydroxycinnamic acids (including chlorogenic acid 40 mg), 135 mg/d flavanols (including epigallocatechin gallate 60 mg) and 108 mg/d flavanones (including naringin 30 mg). As there is no Dietary References Intake (DRI) available for polyphenols, the ~500 mg/d dose was based on several reviews on the bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans and others studies that tested the effects of polyphenols on exercise performance and oxidative stress [274-276]. The 3 g daily dose of  $\omega$ -3 (Omacor, Pierre Fabre Laboratories, Toulouse France) was based on French pharmacopeia recommendations for hypolipemic effects (2-4 g/day) and was provided as 1 pill per meal which is

within the daily dose used in most clinical studies [262, 263]. This daily dose thus corresponded to 1.1 g of eicosapentaenoic acid (EPA) and 1 g of docosahexaenoic acid (DHA). Vitamin E and selenium were given as a single daily pill providing 168 mg of vitamin E associated with 80 µg of selenium (Solgar, Marne la Vallée, France). The DRI for Vitamin E is set at 15 mg/d. The tolerable upper limit (UL) for intake is set at 1 g in adults, therefore the dose from the commercially available pill was 6 times lower than the UL but 11 times higher than DRI. To capitalize on the cocktail effect, the dose of vitamin E was two-fold lower the doses that have provided positive effects on metabolism and muscle [259, 269]. Regarding selenium, the intake reported in most countries presents a large variability. DRI and UL are respectively set at 55 µg and 400 µg per day. The selected dose provided a daily supplement that set the daily intake at 135 µg/d which is 3 times lower than the UL and lower than the dose reported in previous studies [259, 269] in order to capitalize on cocktail effects. The control group did not receive any supplementation or placebo.

### **Body composition**

Fat mass (FM) and lean body mass (LBM) were assessed by using a dual-energy X-ray absorptiometer (DXA, HOLOGIC QDR 4500W, USA) at baseline and on day 20 of the experiment.

### **Physical Activity Patterns**

Time spent in sitting and active was determined using a tri-axial accelerometer (ActiGraph GT3X+; ActiGraph, Pensacola, Fla., USA). Participants were instructed to wear the accelerometer at their right hip at all times except for bathing during one week before the inclusion and during the all experimental protocol. At each visit, both raw accelerometry and activity-counts per min were downloaded using manufacturer software (Actilife 6.13, Pensacola, USA). An automatic activity-recognition algorithm [277], that identifies sitting time, and an activity-specific energy expenditure model [278], both developed by our group, were used to determine time spent in a sitting position and in different activity intensities; cut-points of 1.5-3 METs and >3METs were used for light intensity activity and moderate-to-very vigorous activity, respectively.

### **Glucose tolerance and substrate use**

Subjects reported to the clinic the evening prior to the test. A standard dinner was given containing 47.7% carbohydrates, 32.5% lipids and 17.8% protein for a total of 918 Kcal intake. An oral glucose tolerance test (OGTT) was performed after an overnight fast using a mix of 1g/kg of glucose and 0.5g/kg of fructose diluted in 300mL of water; 1% of fructose was labelled with U-<sup>13</sup>C-fructose (Eurisotop, Paris). Following baseline collection and glucose/fructose ingestion, blood samples were collected every 15-min for the first 3 hours and every 30-min for the 4<sup>th</sup> hour. Carbohydrate and fat oxidation rates were determined every hour using canopy dilution respirometry (Quark, Cosmed, Italy) and the classical equations of indirect calorimetry corrected for urinary nitrogen excretion. Insulin sensitivity was estimated using the Matsuda Index [279]. Metabolic flexibility, defined as the ability to adjust nutrient oxidation to nutrient availability and demand, was assessed during the OGTT by examining the relationship between the variance of plasma insulin and the variance of non-protein respiratory quotient (NPRQ). As explained previously [280] the variance-derived indexes assume a metabolically flexible state when the variance in insulin is low and the variance in NPRQ is high; in other words, when the body has a high capacity to switch from fat to carbohydrate oxidation in association with small changes in insulin concentration in response to the OGTT. A transition towards



a metabolically inflexible state is assumed when the variance in insulin increases and/or the variance in NPRQ decreases.

### **Exogenous fructose oxidation**

Exhaled breath samples were collected at the same time as blood samples. Breath  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotopic ratio was measured in triplicate on a GasBench system (Thermo Scientific, Germany) connected to a continuous-flow isotope ratio mass spectrometer (IRMS, DELTA V, Thermo Scientific, Germany). U- $^{13}\text{C}$ -fructose oxidation was calculated as the cumulated percentage dose recovery of  $^{13}\text{C}$  in expired  $\text{CO}_2$  per hour over the OGTT, as previously described [281].

### **Liver *de novo* lipogenesis**

*De novo* lipogenesis was measured as the apparition of 1- $^{13}\text{C}$ -palmitate from U- $^{13}\text{C}$ -fructose in very low-density lipoprotein (VLDL). In brief, as previously described [281] VLDL were separated by sequential ultracentrifugation and total lipids were extracted from VLDL by a modified Folch technique. TGs were further separated by solid phase extraction and derivatized into methyl esters. The absolute concentration of both unlabelled and labelled palmitate was measured by gas chromatography/mass spectrometry (Agilent 5975, Inert XL) through a dual acquisition program in single ion monitoring m/z ratios of 270 and 271, and calculated by reference to internal standards added to the plasma. The concentration of 1- $^{13}\text{C}$ -palmitate was calculated by multiplying its molar percent enrichment (MPE) by the concentration of total palmitate.

### **Blood sample analyses**

Plasma insulin was assessed by radio-immuno assay, and glucose, NEFA and TG were measured by colorimetric assays and enzymatic methods, as previously described [281]. Reduced and oxidized glutathione (GSH and GSSG, respectively) concentrations were simultaneously measured by reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) as previously described [282]. Total plasma malondialdehyde (MDA) was determined by reverse-phase HPLC [283]. The antioxidant defenses were examined using a test based on *in vitro* free-radical-induced blood hemolysis KRL test (Kirial International/Spiral, Couternon, France) as previously described [284].

### **Muscle biopsies and parameters**

Muscle biopsies were performed on the mid *Vastus Lateralis* (VL) under aseptic conditions and after anaesthesia (2% w/v lidocaine HCl) using Bergström skeletal muscle biopsy needle (Lauran Médical®, KBM 5/10). One piece was mounted in tragacanthum gum (OCT Compound) for histological analysis, cooled to the temperature of liquid nitrogen in isopentane, and the remainder was snap frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until further analysis.

### ***Immunohistochemical classification of muscle fibers and cross-sectional area measurements:***

Transverse serial cross sections (10  $\mu\text{m}$  thick) of vastus lateralis muscle samples were obtained using a cryostat at  $-25^\circ\text{C}$  (HM-560, Microm H), and mounted onto glass microscope slides. Before labeling, sections were dried and fixed for 10 min in acetone. Sections were then washed in phosphate buffered saline (PBS), blocked and permeabilized with 0.1% Triton-X100 and 20% horse serum. For muscle fiber typing and cross sectional areas (CSA) determination, sections were incubated with anti-MyHC primary antibodies (anti-slow (I) MyHC, BA-D5, Developmental Studies Hybridoma Bank, 1:10; anti-

fast (II) MyHC, M4276, Sigma-Aldrich, 1:200), and anti-fast (IIA) MyHC, SC-71, Developmental Studies Hybridoma Bank, 1:10) for 1 h at 37°C, followed by washes in PBS and incubation with the secondary antibodies (ALEXA 488, A11029, Invitrogen, 1:800; ALEXA 568, A11031, Invitrogen, 1:800) for 1 h. Fiber typing was manually determined, and the fiber sizes were analyzed with Image J software (1.46r version). A total of approximately 300 myofibers per sample were thus measured in double-immunostained pre- and post-DI VL cryosections.

**Protein expression:** Muscle samples were homogenized in 10 volumes of lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 100 mM NaF, 5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% Triton X-100, 1% SDS, 40 mM β-glycerophosphate and protease inhibitor mixture [P8340; Sigma-Aldrich]) and centrifuged at 10,000 g for 10 min (4°C). Sixty micrograms of protein extract were loaded into Stain-Free 4-20% precast gels (4568095; Bio-Rad) before electrophoretic transfer onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad; Trans-Blot Turbo Blotting System). After transfer, the membranes were blocked with 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20 (TBS-T) containing 5% skimmed milk or bovine serum albumin (BSA) and incubated overnight at 4°C with primary antibodies. The membranes were then incubated for 1 h with a peroxidase-conjugated secondary antibody. The immunoblots were revealed using a Pierce ECL kit (32106; Thermo Scientific), and proteins were visualized by enhanced chemiluminescence using the ChemiDoc Touch Imaging System and quantified with Image Lab™ Touch Software (version 5.2.1). Stain-Free technology or red Ponceau or GAPDH were used as loading control.

**Citrate Synthase Activity:** Citrate synthase activity of muscle samples was measured using a commercially available kit, as reported before [285].

### **Data and statistical analysis**

The effects of the intervention and the cocktail supplementation on the outcomes were assessed by using mixed linear effects models with group, intervention, group-by-intervention interaction and baseline values as fixed effects and subjects as random effect. Additional adjustment for changes in FM and LBM was performed for substrate oxidation. Between-group and within-group differences were assessed by using post-hoc tests. Data obtained during OGTT are presented as area under the curve (AUC). Significance was set up at 0.05 for main effects and 0.10 for interaction effects. Values are mean ± SEM, unless otherwise stated. Statistical analyses were performed with SAS version 9.4 (SAS Institute, Cary, USA).

## **RESULTS**

### **Subjects' characteristics and changes in time spent physically active and sitting**

Subjects' characteristics and changes in activities are presented in **Table 1**. Participants' compliance was very good; over the 20-day intervention daily steps went down from 14,952 ± 1,720 steps to 3,009 ± 298 steps in the supplemented group and from 13,032 ± 875 steps to 2,645 ± 331 steps in the control group. We observed in both groups a reduction of both light-intensity activity and moderate-to-very vigorous intensity activity, along with a significant increase in time spent sitting during waking hours. Although the intervention did not modify body and lean mass, we observed a significant increase in FM, of less than 1kg, independent of the cocktail supplementation.

### Glucose tolerance and insulin sensitivity

Fasting plasma glucose and insulin were neither affected by the intervention nor by the cocktail supplementation (**Table 2**). Concentrations of glucose, TG and insulin during the OGTT are presented in **Figures 2A, 2B, 2C** respectively. To increase readability of the results, data are also presented as AUC in **Figure 3**. During the OGTT, glucose concentration did not change between control and supplemented groups (**Figure 3B**); insulin increased after 10 days of reduction in daily steps (**Figure 3A**) but did not further change after 10 more days of inactivity combined with fructose overfeeding. Reduction in daily steps decreased insulin sensitivity in both groups as indicated by the decrease in Matsuda index (**Figure 3C**). Fasting high molecular weight (HMW) adiponectin increased during the intervention in both groups, but the increase was greater in the supplemented group compared to the control group after 20 days of intervention (**Table 2**). Total carbohydrate oxidation (**Figure 3D**) and exogenous fructose oxidation (**Figure 3E**) during the OGTT increased similarly in both groups after both 10 and 20 days of intervention. While a group-by-intervention interaction almost reached significance for an increase in insulin variance, significant decrease in NPRQ variance was observed during the OGTT in the control group after both 10 and 20 days of intervention, that was fully prevented by the supplementation (**Figure 3F**). This indicates a development of metabolic inflexibility in the control group but not in the supplemented group, that was likely due to decreased oxidative capacities in association with whole body metabolic adaptations. Of note, most metabolic changes were observed after 10 days of inactivity only; the addition of 10 more days of reduced daily steps combined with fructose overfeeding did not lead to further modifications in metabolic flexibility.

### Lipid metabolism

Fasting TG and HDL respectively increased and decreased in the control group after both 10 and 20 days of intervention (**Table 2**). Similar responses were observed during the OGTT. TG (**Figure 4A**), VLDL-TG (**Figure 4B**), palmitate VLDL-TG (**Figure 4C**) and *de novo* lipogenesis from fructose (**Figure 4D**) gradually and significantly increased after 10 and 20 days of intervention in the control group. The intervention decreased total lipid oxidation in association with an increase in net lipid synthesis both in the fasting states and following the OGTT (**Table 4 & Figure 4E**), as indicated by the negative values of lipid oxidation, thus confirming the increase in *de novo* lipogenesis as measured by stable isotopes. The cocktail supplementation fully prevented the increase in lipemia (**Table 2**) in both fasting state and during the OGTT (**Figure 4A**), the decrease in total lipid oxidation (**Table 2 and Figure 4E**) and the increase in *de novo* lipogenesis measured both by tracer technique (**Figure 4D**) and indirect calorimetry (**Table 2**) induced by the daily step reduction with or without fructose overfeeding.

### Anti-oxidant capacity

Fasting oxidative markers remained unaffected by either the intervention or the supplementation (**Table 3**). However, blood anti-oxidant capacity following the OGTT decreased in the control group when the fructose overfeeding was added to the daily step reduction while the supplemented group remained at significantly higher values of whole blood anti-oxidant capacity (**Figure 4F**).

### Skeletal muscle analysis

Muscle parameters are presented in **Table 5**. While type I fibers CSA was lower in both groups at the end of the intervention, the decrease in type IIa CSA observed in the control group, was prevented by the cocktail supplementation. In line with this observation, ubiquitination content, a protein marker of proteolysis processes, increased only in the control group. At the mitochondrial level both Mitofusin-2 and PGC1 $\alpha$  contents dropped in response to the intervention. We failed to see a protective effect of the cocktail. FATP1, involved in fatty acid transportation at the mitochondrial level, tended to rise in the cocktail group only ( $p=0.07$ ), supporting the maintenance of lipid oxidation during the intervention in the supplemented but not in the control group. No changes in citrate synthase activity, skeletal muscle intracellular signaling protein contents and oxidative stress markers were observed.

## DISCUSSION

The main findings of this randomized interventional study in lean healthy trained young male are that (i) a reduction in daily light intensity activity and moderate-to-vigorous activity along with an increase in time spent sedentary leads to decreased insulin sensitivity, total fat oxidation, hyperlipemia and increased *de novo* lipogenesis; and (ii) a nutrient cocktail supplement prevents the alterations on lipid metabolism but not insulin sensitivity. This is the first study to test the efficacy of a nutrient cocktail to counteract the negative effects of physical inactivity along with fructose overfeeding.

During the intervention, subjects decreased on average their activity to <3,000 steps per day. Body weight and LBM remained stable during the study but FM and the percentage of body fat increased. The effect on body weight is not surprising. It is likely to be influenced by 1) the known delayed compensatory adjustment in energy intake, 2) the duration of the intervention, given some [238, 286], but not all studies [287, 288] with 7-14 days decreased activity reported weight gain, and 3) the fructose overfeeding between 10-20 days, as others have also reported an increase in FM with overfeeding [238]. The increase in FM is thus in line with the design of the study. Overall, LBM was preserved during the study though there was a decrease in type II muscle fibers CSA in the control group, suggesting that the cocktail supplementation may delay muscle disuse atrophy.

There was a decrease in insulin sensitivity during the 20-day intervention, in agreement with other studies when activity was reduced for 3-14 days [238, 286, 287, 289-291]. This was mainly due to increased insulin AUC during the OGTT while we did not show a change in glucose, in agreement with some (2,9) but not all studies [287, 290]. The additional fructose provided after day 10 did not affect insulin sensitivity but there was a significant increase in carbohydrate oxidation and exogenous fructose oxidation. Knudsen et al. [238] reported similar glucose and insulin responses to an OGTT following 14 days of reduced activity and a 50% increase in energy intake. While the Matsuda index, in that study, was significantly lower at day 7 but not day 14, clamp-derived insulin sensitivity had decreased by ~44%. In agreement with other studies of decreased activity [238] or bed-rest [292], we reported an increase in fasting plasma adiponectin after 20 days of decreased activity. This is in contrast with studies where decreased adiponectin is associated with insulin resistance. It is possible that, in these healthy individuals, an increase in adiponectin may be a short-term compensatory mechanism to preserve insulin sensitivity. In support of this we did not find a change in Akt and GSK3 proteins following the intervention. This would need to be further investigated but given the preservation of metabolic flexibility, the effects appear to be more pronounced on lipid metabolism.

By using bed-rest ranging from 7 to 90 days in men and women we have shown that a hallmark of physical inactivity physiology is a decrease in exogenous lipid clearance due to both a reduced uptake and oxidative capacity at the muscle level (see [280] for review). We further showed in the general population through training/detraining studies that activity energy expenditure is a major determinant of lipid trafficking (plasma pools, chylomicrons, VLDL) and partitioning through uptake (LPL, FAT/CD36, FABPpm) between oxidation (LCcOA synthase, CPT1) and storage (mtGPAT) within the skeletal muscle [293]. In the present study, we observed that physical inactivity by voluntary step reduction and physical inactivity plus fructose overfeeding gradually decreased fasting and postprandial fat oxidation to an extent where only net lipid synthesis was observed during the OGTT; similar to our observation during an OGTT following 7-days bed-rest in men and women [138]. One of the striking results of the present study is the capacity of the cocktail to fully prevent the effects on lipid oxidation, thus likely preventing the hypertriglyceridemia of the control group.

Although no similar data exist, numerous recent studies investigating the impact of various bio-active compounds from the diet, taken as cocktails, in various physio-pathological states and models support our results [271, 294-296]. However, mechanistic evidence primarily comes from rodent models. Vitamin E plus  $\omega$ -3 fatty acids supplementation was hepato-protective in naturally aging rats, with major anti-oxidant properties, especially in the brain [297]. It was argued that vitamin E reduces the peroxidation of  $\omega$ -3 fatty acids thus allowing synergistic effects. In support of that, fish oils associated with grape polyphenols in rats fed a high sucrose diet improved numerous blood biochemical parameters such as HDL and TG, as in our study, by significantly enhancing fatty acid beta oxidation [298]. Interestingly, the same study showed a major suppression of lipogenic enzymes by their cocktail, in agreement with our human data. A recent review [299] reported evidence that polyphenols play key controlling roles in suppressing *de novo* lipogenesis in various models of non-alcoholic fatty liver diseases. Selenium is often co-supplemented with vitamin E but is likely to have had limited impact in this study. Supplementation with selenium has independent effects on insulin sensitivity and insulin secretion but no effect on lipid profiles [260]. In this study the main changes were in lipid metabolism with no changes in glucose/insulin parameters.

The beneficial effects of fish oils  $\omega$ -3 fatty acids on lipemia by lowering TG and rising HDL have been well known for decades [300]. In overweight/obese subjects supplemented with  $\omega$ -3 fatty acids and polyphenols there is a substantial improvement in fasting plasma HDL and their sub-classes [294] as well as post-prandial TG and triglyceride-rich lipoproteins [295]. Annuzzi et al. [295] showed reduced oxidative damage through a reduced excretion of 8-isoprostane. This data supports the improved global anti-oxidant capacity we observed in our study during the OGTT. The impact on oxidative stress could have been augmented by the co-supplementation of vitamin E and selenium, both recognized as ROS scavengers [254, 255, 259]. Of note, the impact of our cocktail on various markers of anti-oxidant capacity or oxidative markers was quite modest. One may thus argue that, in our study, the principal effects were due to the  $\omega$ -3 fats, known to boost the whole muscle machinery of lipid metabolism [301], and to a lesser extent to the polyphenols and vitamin E/selenium. However, a recent study of 12-week supplementation with epigallocatechin-3-gallate and resveratrol showed major impact on mitochondrial capacity and fat oxidation in overweight/obese men and women [271]. In agreement with our data, they did not observe an improvement in insulin sensitivity. In addition, Annuzzi et al.

[295] found that the polyphenols reduced circulating TG and VLDL while  $\omega$ -3 reduced postprandial cholesterol and VLDL apolipoprotein B-48. While the cocktail may benefit physically inactive and unhealthy individuals, it could also optimize the effects of training on lipid metabolism. In this line, Ota et al. showed supplementation in green tea extract beverage rich in catechins for two months, concomitant to aerobic exercise training increased fat oxidation rates during exercise [302]. Altogether these data support the positive effect on lipid metabolism associated with the cocktail supplementation in our study.

While there is strong evidence which support our results on lipid metabolism following polyphenols and  $\omega$ -3 supplementation, we also observed interesting effects on the muscle phenotype itself. Indeed, the muscle is known to be plastic in response to mechanical loading and unloading and it was expected that reduction in physical activity, by  $\sim$ 10000 steps/d, would have a detraining and deconditioning effect in healthy trained subjects. There was a global decrease in muscle fiber CSA with significant reductions in type 1 and type 2 fibers. Such plasticity in response to exercise or chronic hypoactivity is well known [303]. Interestingly, these adverse effects on type 2 muscle fibers were prevented by the cocktail and may be associated with the decrease in ubiquitination content, factors known to be associated to muscle deconditioning and fiber atrophy. We have previously shown that resveratrol prevented disuse muscle atrophy of hind-limb suspended rats [214] and a recent study reported that  $\omega$ -3 fatty acids delays muscle degradation in mice [304]. It is possible that these components of the nutrient cocktail are responsible for preserving type 2 fiber CSA in this study as there is no evidence for a role of vitamin E or selenium. However, there are no mechanistic studies examining the effects of nutrient cocktails and further experiments are required.

Limitations must be acknowledged. The control group did not take a placebo supplement due to difficulties to find a neutral oil to encapsulate. This being said the magnitude of the effects we observed suggest this would have a minor impact on the conclusion of the study. The molecular parameters we selected did not allow us to fully unravel the mechanisms at play and further mechanistic studies are required. Finally, we acknowledge that subjects taking  $>$ 14,000 step/d does not represent the general population and the interpretation of the results are delimited to young active men. While recommending physical activity is a central component of health promotion policies, not enough people achieve the recommendations and therefore nutritional strategies to offset some of the deleterious effects of physical inactivity are important. Therefore, further studies are needed on less active populations and in at-risk populations for developing metabolic diseases.

In conclusion, we have demonstrated that the negative effects of physical inactivity on lipid metabolism can be mitigated by micronutrient supplementation. We have established that the early decrements in lipid oxidation contribute to increased *de novo* lipogenesis but that a nutrient cocktail containing polyphenols,  $\omega$ -3 fatty acids and other compounds can effectively prevent these changes during 20-days of decreased physical activity. These data highlight the importance of regular physical activity to maintain carbohydrate and lipid metabolism. It is possible that this supplementation could be an effective prevention strategy for chronic diseases such as cardiovascular disease and type 2 diabetes but long-term studies, especially in high risk groups, are now required.

**Acknowledgements**

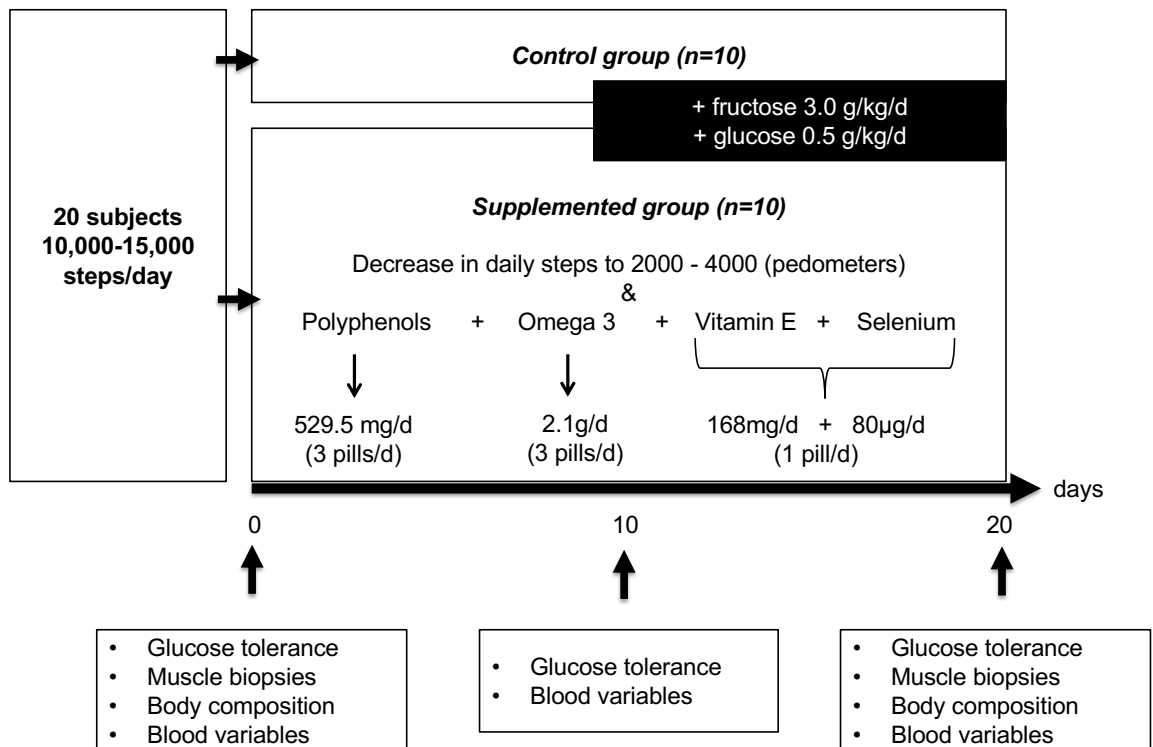
We are thankful to the participants and the medical, nutrition and administrative staff of the MEDES – Institut de Médecine et Physiologie Spatiale.

**Funding:** This work was supported by grants from the CNRS and from the European (ESA) and French (CNES) Space Agencies. AD and RD are supported by graduate fellowships from CNES.

**Clinical trial registration:** NCT03313869

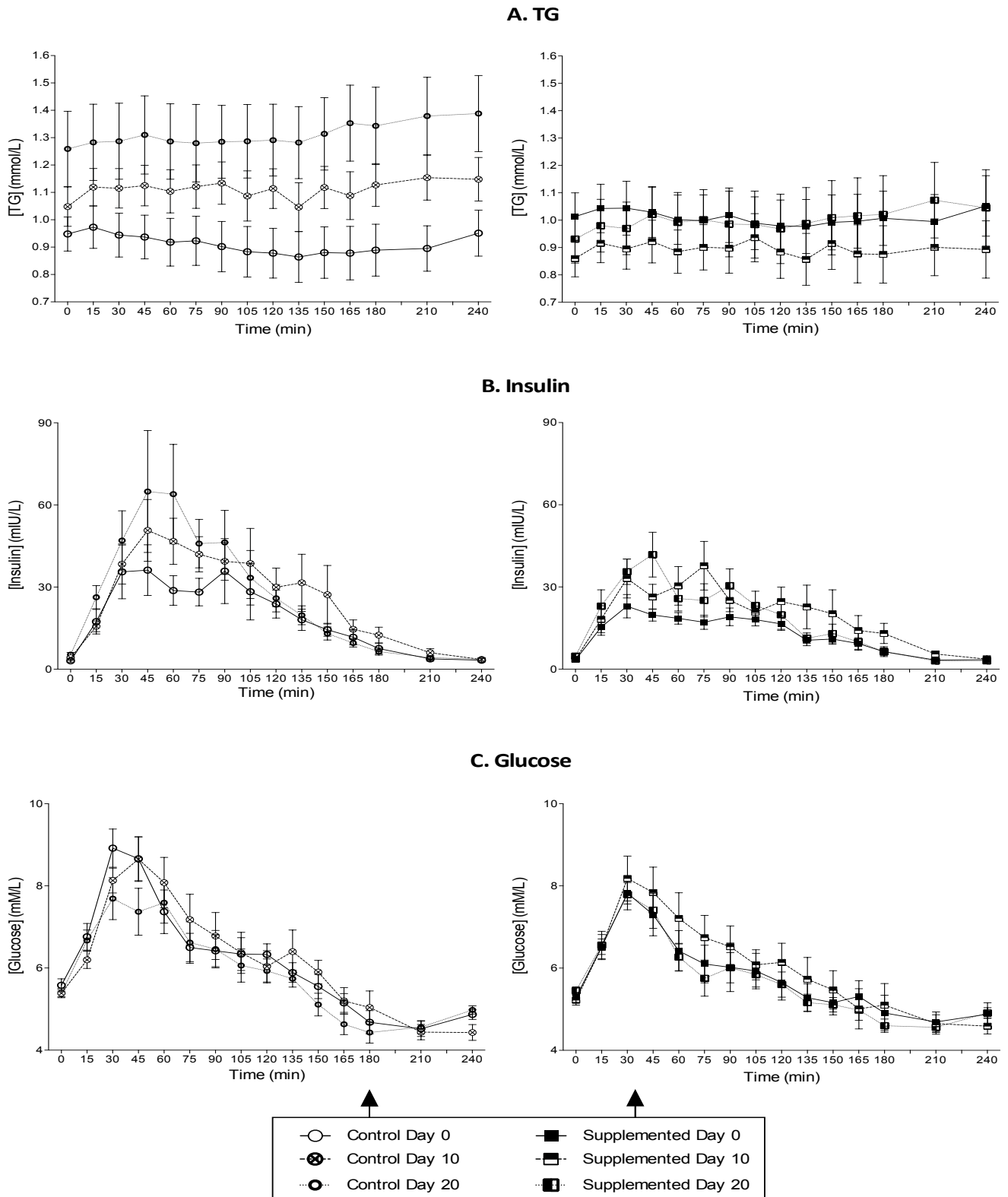
**Disclosure summary**

Michel Prost, director of Spiral company developed the cocktail XXS-2A to market it if efficient.



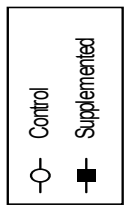
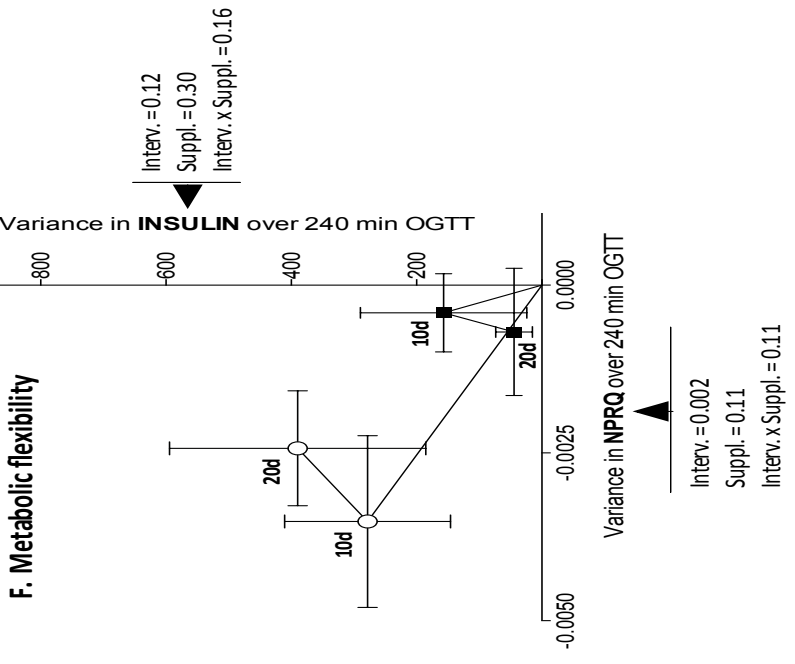
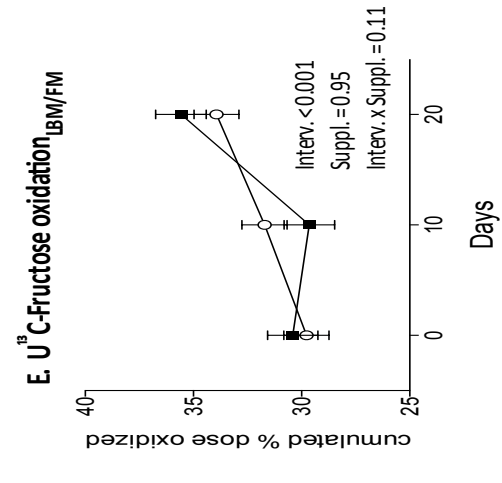
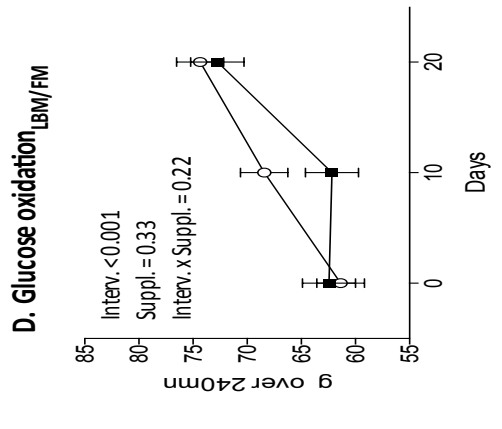
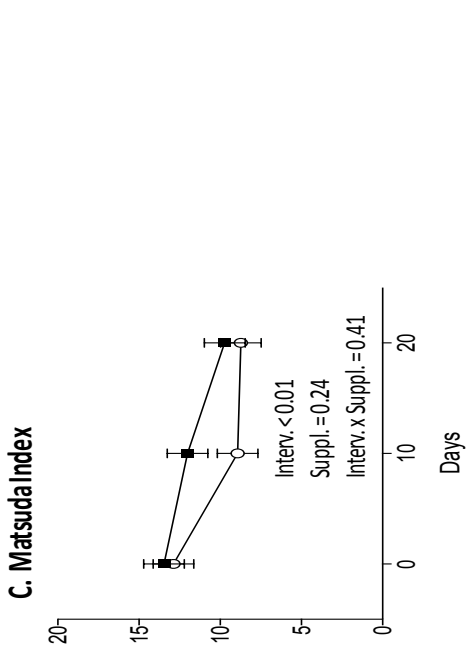
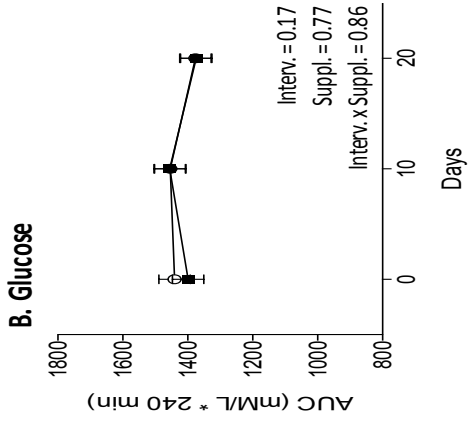
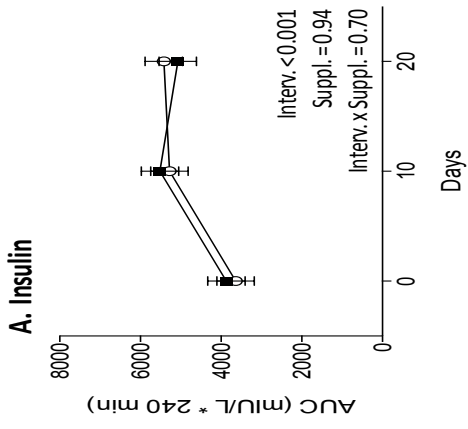
**Figure 1: Design of the study**





**Figure 2: Plasma TG, insulin and glucose concentrations during the OGTT**

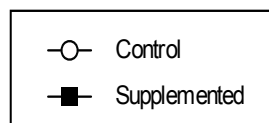
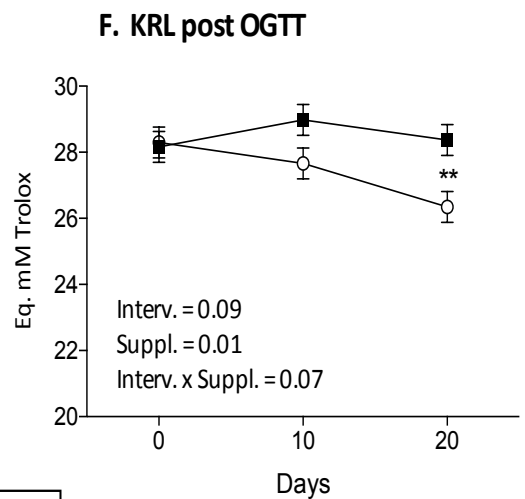
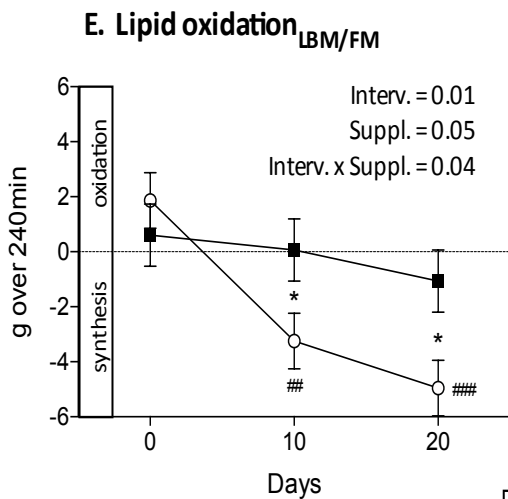
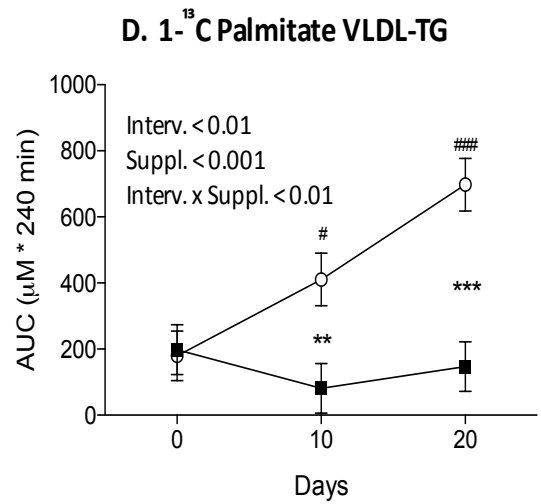
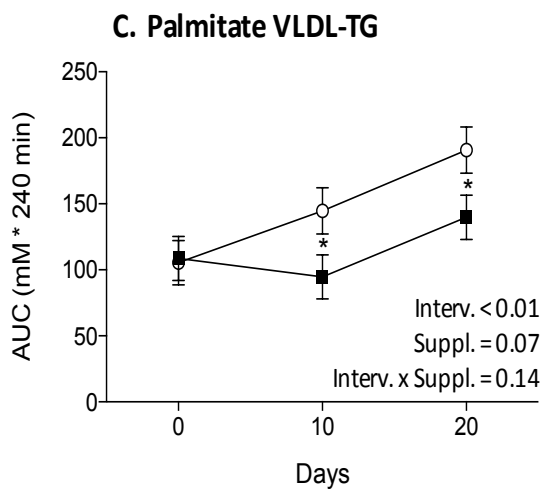
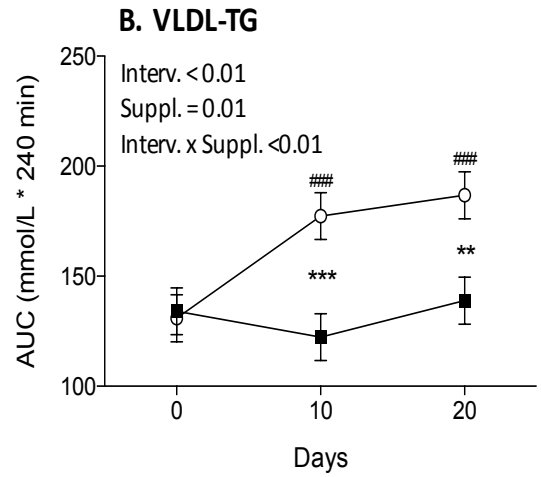
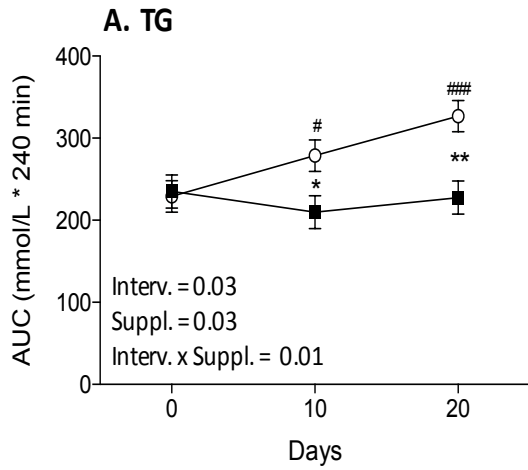
Evolution of plasma TG (A), insulin (B) and glucose (C) concentrations during an oral glucose tolerance test in the Control (left) (n=10) and Supplemented (right) (n=10) groups before the intervention, after 10 days of reduced physical activity and after 10 more days of physical inactivity coupled with fructose/glucose overnutrition. Values are means  $\pm$  SEM.



### **Figure 3: Carbohydrate metabolism**

Area under the curve calculated over each OGTT for plasmatic insulin (A), glucose concentration (B), Matsuda index (C) and U<sup>13</sup>C-Fructose oxidation (E) over 20 days of reduced physical activity in Control (n=10) and Supplemented (n=10) groups. Area under the curve calculated over each OGTT for Glucose oxidation (D) and metabolic flexibility (F) over 20 days of reduced physical activity in Control (n=10) and Supplemented (n=8) groups. Reported data have been adjusted for baseline. Oxidation data are adjusted on fat mass (FM) and fat-free mass (FFM).

Results of the linear mixed model analysis are displayed on the figure with p-value for intervention (Interv.), cocktail supplementation (Suppl.) and the supplementation-by-intervention interaction (Interv. x Suppl.). Between-group differences were assessed by using post-hoc tests at each time point and are represented as follow \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001. Values are means ± SEM.



#### **Figure 4: Lipid metabolism and free radicals defense**

Area under the curve calculated over each OGTT for plasmatic triglycerides (A), VLDL-TG (B), palmitate VLDL-TG (C), 1-<sup>13</sup>C Palmitate VLDL-TG (D), and KRL (F) over 20 days of reduced physical activity and fructose overfeeding in Control (n=10) and Supplemented (n=10) groups. Area under the curve calculated over each OGTT for lipid oxidation (E) over 20 days of reduced physical activity and fructose overfeeding in Control (n=10) and Supplemented (n=8) groups. Reported data have been adjusted for baseline. Oxidation data are adjusted on fat mass (FM) and fat-free mass (FFM).

Results of the linear mixed model analysis are displayed on the figure with p-value for intervention (Interv.), cocktail supplementation (Suppl.) and the supplementation-by-intervention interaction (Interv. x Suppl.). Between-group differences were assessed by using post-hoc tests at each time point and are represented as follow \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001. #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 vs baseline. Values are means ± SEM.

| Variables  | Baseline        |                  |                |                | day 10         |                |                |                | day 20         |                |                |                | Mixed model <sup>1</sup> |      |              |             |      |
|--|-----------------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------------------|------|--------------|-------------|------|
|  | Control         |                  | Supplemented   |                | Control        |                | Supplemented   |                | Control        |                | Supplemented   |                | Supplementation          |      | Intervention | Interaction |      |
|  | n=10            | n=10             | n=10           | n=10           | n=10           | n=10           | n=10           | n=10           | n=10           | n=10           | n=10           | n=10           | n=10                     |      |              |             |      |
| Weight (kg)  | 77.5 ± 2.3      | 76.5 ± 2.2       | 77.6 ± 2.2     | 76.7 ± 2.3     | 77.8 ± 2.1     | 76.9 ± 2.4     | 76.9 ± 2.4     | 76.9 ± 2.4     | 77.8 ± 2.1     | 76.9 ± 2.4     | 76.9 ± 2.4     | 76.9 ± 2.4     | 76.9 ± 2.4               | 0.89 | 0.28         | 0.87        | 0.87 |
| Fat mass (kg)  | 16.9 ± 1.4      | 17.8 ± 1.8       | 17.2 ± 1.4     | 18.1 ± 1.7     | 17.4 ± 1.3     | 18.3 ± 1.7     | 18.3 ± 1.7     | 18.3 ± 1.7     | 17.4 ± 1.3     | 18.3 ± 1.7     | 18.3 ± 1.7     | 18.3 ± 1.7     | 18.3 ± 1.7               | 0.44 | <0.001       | 0.75        | 0.75 |
| Fat mass (%)   | 22.0 ± 1.4      | 23.4 ± 2.0       | 22.3 ± 1.4     | 23.8 ± 2.0     | 22.6 ± 1.3     | 24.1 ± 2.0     | 24.1 ± 2.0     | 24.1 ± 2.0     | 22.6 ± 1.3     | 24.1 ± 2.0     | 24.1 ± 2.0     | 24.1 ± 2.0     | 24.1 ± 2.0               | 0.58 | <0.001       | 0.89        | 0.89 |
| Lean Body mass (kg)  | 56.7 ± 1.5      | 54.7 ± 1.7       | 56.5 ± 1.4     | 54.5 ± 1.8     | 56.4 ± 1.4     | 54.4 ± 1.9     | 54.4 ± 1.9     | 54.4 ± 1.9     | 56.4 ± 1.4     | 54.4 ± 1.9     | 54.4 ± 1.9     | 54.4 ± 1.9     | 54.4 ± 1.9               | 0.87 | 0.32         | 0.92        | 0.92 |
| Daily steps  | 13032.6 ± 875.1 | 14951.7 ± 1720.1 | 2511.8 ± 235.3 | 2663.8 ± 359.7 | 2644.9 ± 330.7 | 3008.9 ± 297.8 | 3008.9 ± 297.8 | 3008.9 ± 297.8 | 2644.9 ± 330.7 | 3008.9 ± 297.8 | 3008.9 ± 297.8 | 3008.9 ± 297.8 | 3008.9 ± 297.8           | 0.69 | <0.001       | 0.40        | 0.40 |
| Time spent sitting during waking time (min.day <sup>-1</sup> )                 | 445.9 ± 37.7    | 461.7 ± 29.4     | 477.7 ± 43.3   | 528.2 ± 39.7   | 552.0 ± 42.2   | 527.6 ± 41.6   | 527.6 ± 41.6   | 527.6 ± 41.6   | 552.0 ± 42.2   | 527.6 ± 41.6   | 527.6 ± 41.6   | 527.6 ± 41.6   | 527.6 ± 41.6             | 0.98 | <0.01        | 0.22        | 0.22 |
| Time spent in light-intensity activity (min.day <sup>-1</sup> )                | 213.8 ± 22.5    | 206.0 ± 21.9     | 114.5 ± 20.2   | 119.2 ± 23.4   | 125.8 ± 26.7   | 130.9 ± 23.8   | 130.9 ± 23.8   | 130.9 ± 23.8   | 125.8 ± 26.7   | 130.9 ± 23.8   | 130.9 ± 23.8   | 130.9 ± 23.8   | 130.9 ± 23.8             | 0.58 | <0.05        | 0.74        | 0.74 |
| Time spent in moderate to vigorous intensity activity (min.day <sup>-1</sup> ) | 104.5 ± 10.5    | 134.3 ± 17.7     | 18.2 ± 4.8     | 21.7 ± 7.7     | 17.6 ± 3.2     | 29.1 ± 9.2     | 29.1 ± 9.2     | 29.1 ± 9.2     | 17.6 ± 3.2     | 29.1 ± 9.2     | 29.1 ± 9.2     | 29.1 ± 9.2     | 29.1 ± 9.2               | 0.67 | <0.001       | 0.69        | 0.69 |

**Table 1: Anthropometry and physical activity data**

Means are ± SEM. <sup>1</sup>Mixed models are adjusted on baseline.

**Table 2. Fasting metabolites and hormones**

| Variables                 | Baseline    |              | day 10      |                            | day 20                    |                             | <sup>1</sup> Mixed model |              |        |
|---------------------------|-------------|--------------|-------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------|--------|
|                           | Control     | Supplemented | Control     | Supplemented               | Control                   | Supplemented                | Supplementation          | Intervention |        |
|                           | n=10        | n=10         | n=10        | n=10                       | n=10                      | n=10                        |                          |              |        |
| <b>Metabolites</b>        |             |              |             |                            |                           |                             |                          |              |        |
| Glucose (mM)              | 5.58 ± 0.16 | 5.29 ± 0.12  | 5.39 ± 0.09 | 5.22 ± 0.12                | 5.39 ± 0.11               | 5.45 ± 0.10                 | 0.83                     | 0.28         | 0.18   |
| HOMA index                | 0.76 ± 0.13 | 0.80 ± 0.13  | 1.00 ± 0.07 | 0.84 ± 0.12                | 1.30 ± 0.21               | 1.16 ± 0.21                 | 0.15                     | <0.001       | 0.54   |
| TG (mmol/L)               | 0.95 ± 0.06 | 1.01 ± 0.09  | 1.05 ± 0.07 | 0.86 ± 0.07 <sup>*#</sup>  | 1.26 ± 0.14 <sup>##</sup> | 0.93 ± 0.09 <sup>***</sup>  | 0.01                     | 0.04         | 0.01   |
| HDL (mmol/L)              | 1.31 ± 0.04 | 1.23 ± 0.06  | 1.18 ± 0.04 | 1.29 ± 0.08 <sup>***</sup> | 1.20 ± 0.06               | 1.30 ± 0.07 <sup>***</sup>  | <0.001                   | 0.25         | <0.001 |
| LDL (mmol/L)              | 2.90 ± 0.22 | 2.69 ± 0.19  | 2.88 ± 0.21 | 2.94 ± 0.18                | 3.08 ± 0.26               | 3.05 ± 0.25                 | 0.18                     | <0.01        | 0.18   |
| <b>Hormones</b>           |             |              |             |                            |                           |                             |                          |              |        |
| Insulin (mU/L)            | 3.05 ± 0.49 | 3.40 ± 0.52  | 4.16 ± 0.29 | 3.57 ± 0.49                | 5.33 ± 0.77               | 4.74 ± 0.85                 | 0.07                     | <0.001       | 0.35   |
| Total adiponectin (µg/mL) | 5.19 ± 0.68 | 6.99 ± 1.54  | 5.36 ± 0.94 | 7.27 ± 1.04                | 6.73 ± 1.05               | 9.22 ± 1.33                 | 0.29                     | <0.001       | 0.75   |
| HMW adiponectin (µg/mL)   | 2.93 ± 0.43 | 4.18 ± 0.74  | 3.08 ± 0.41 | 4.60 ± 0.66                | 3.99 ± 0.64 <sup>##</sup> | 6.27 ± 0.85 <sup>***#</sup> | 0.15                     | <0.001       | 0.05   |

**Table 2: Fasting metabolites and hormones**

Means are ± SEM. <sup>1</sup>Mixed models are adjusted on baseline.

Post-hoc tests: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs control. #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 vs baseline.

HOMA index: Homeostasis model assessment of insulin resistance; TG: Triglycerides; HDL: High Density Lipoprotein; LDL: Low Density Lipoprotein; HMW: High Molecular Weight

**Table 3. Fasting oxidative stress**

| Variables                            | Baseline     |              | day 10        |              | day 20       |              | <sup>1</sup> Mixed model |              |      |
|--------------------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------------------|--------------|------|
|                                      | Control      | Supplemented | Control       | Supplemented | Control      | Supplemented | Supplementation          | Intervention |      |
|                                      | n=10         | n=10         | n=10          | n=10         | n=10         | n=10         |                          |              |      |
| Malondialdehyde (µg/mL)              | 0.78 ± 0.05  | 0.70 ± 0.07  | 0.67 ± 0.05   | 0.81 ± 0.05  | 0.69 ± 0.08  | 0.74 ± 0.05  | 0.27                     | 0.79         | 0.22 |
| KRL (mEq Trolox)                     | 24.16 ± 1.16 | 23.38 ± 0.89 | 23.09 ± 0.84  | 23.70 ± 0.81 | 22.72 ± 1.00 | 22.26 ± 0.64 | 0.54                     | 0.13         | 0.48 |
| Reseda 1 (Glucosides, mEq, Trolox)   | 3.34 ± 0.18  | 3.52 ± 0.19  | 3.75 ± 0.23   | 4.02 ± 0.22  | 3.54 ± 0.21  | 3.32 ± 0.16  | 0.81                     | 0.10         | 0.56 |
| Reseda 2 (Sulphates, mEq, Trolox)    | 2.65 ± 0.16  | 2.65 ± 0.19  | 2.83 ± 1.13   | 3.10 ± 0.22  | 2.69 ± 0.12  | 2.78 ± 0.15  | 0.78                     | 0.43         | 0.77 |
| Reseda 3 (Glucuronides, mEq, Trolox) | 4.95 ± 0.20  | 5.26 ± 0.25  | 5.95 ± 0.28   | 5.64 ± 0.30  | 5.00 ± 0.19  | 4.99 ± 0.21  | 0.13                     | <0.01        | 0.11 |
| GSH                                  | 143.0 ± 19.7 | 227.5 ± 51.2 | 146.2 ± 15.0  | 229.9 ± 21.6 | 227.7 ± 71.9 | 292.2 ± 74.2 | 0.54                     | 0.17         | 0.99 |
| GSSG                                 | 334.9 ± 22.3 | 313.5 ± 28.9 | 329.0 ± 10.85 | 339.4 ± 25.6 | 331.4 ± 14.5 | 343.1 ± 26.9 | 0.21                     | 0.79         | 0.27 |
| GSH/GSSG ratio                       | 0.42 ± 0.05  | 0.86 ± 0.28  | 0.45 ± 0.05   | 0.72 ± 0.10  | 0.64 ± 0.16  | 0.85 ± 0.18  | 0.52                     | 0.27         | 0.77 |

**Table 3: Fasting oxidative stress and damages**

Means are ± SEM. <sup>1</sup>Mixed models are adjusted on baseline.

Post-hoc tests: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs control.

KRL: Total antiradical defense potential (in French, Kit Radicaux Libres); Reseda (in French, RESErves Défenses Antioxydantes) 1, 2 and 3: antiradical defense reserves unmasked by treatment of serum with respectively glucosides, sulphates or glucuronides. GSH: Reduced Glutathione; GSSG: Oxidized Glutathione.



**Table 4. Fasting substrate oxidation**

| Variables                  | Baseline       |                | day 10         |                | day 20         |                | <sup>1</sup> Mixed model |              |             |
|----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------------------|--------------|-------------|
|                            | Control        | Supplemented   | Control        | Supplemented   | Control        | Supplemented   | Supplementation          | Intervention | Interaction |
|                            | n=10           | n=8            | n=10           | n=8            | n=10           | n=8            |                          |              |             |
| NPRQ                       | 0.93 ± 0.03    | 0.94 ± 0.03    | 1.04 ± 0.03    | 1.02 ± 0.03    | 1.07 ± 0.03    | 0.97 ± 0.03    | 0.20                     | <0.01        | 0.16        |
| Lipid oxidation (mg/min)   | 24.48 ± 8.47   | 15.24 ± 9.54   | -8.47 ± 8.47   | -6.64 ± 9.51   | -19.77 ± 8.48  | 4.03 ± 9.50    | 0.53                     | <0.01        | 0.18        |
| Glucose oxidation (mg/min) | 196.08 ± 15.08 | 203.71 ± 16.88 | 232.07 ± 15.05 | 220.82 ± 16.88 | 252.86 ± 15.04 | 254.50 ± 16.90 | 0.97                     | <0.01        | 0.81        |

**Table 4: Fasting energy & substrate oxidation**

<sup>1</sup>Mixed models are adjusted on baseline, fat mass and fat-free mass. Data are presented as LSMeans ± SEM.

Post-hoc tests: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs control.

RMR: Resting metabolic rate; NPRQ: Non-protein respiratory quotient

**Table 5. Vastus lateralis western blots and enzyme activity**

| Variables                                       | Baseline       |                |                               | day 20                        |              |                 | <sup>1</sup> Mixed model |             |  |
|---|----------------|----------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------|-----------------|--------------------------|-------------|--|
|   | Control        | Supplemented   | Control                       | Control                       | Supplemented | Supplementation | Intervention             | Interaction |  |
|   | n=8            | n=10           | n=10                          | n=10                          | n=9          |                 |                          |             |  |
| <b>Muscle fiber type</b>                        |                |                |                               |                               |              |                 |                          |             |  |
| CSA MHC1 (μm2)                                  | 5330.6 ± 399.0 | 4968.8 ± 314.3 | 3951.5 ± 267.6                | 4453.4 ± 349.2                | 0.27         | <0.01           | 0.18                     |             |  |
| CSA MHC2A (μm2)                                 | 5477.8 ± 478.3 | 5184.0 ± 329.4 | 4303.4 ± 230.3 <sup>###</sup> | 4990.3 ± 261.7 <sup>***</sup> | 0.001        | <0.01           | <0.01                    |             |  |
| CSA MHC hybrid (μm2)                            | 0.0 ± 0.0      | 582.3 ± 582.3  | 2763.8 ± 759.8                | 2514.2 ± 756.6                | 0.35         | <0.001          | 0.25                     |             |  |
| MHC1 (%)  | 67.8 ± 5.8     | 62.3 ± 4.2     | 52.7 ± 3.4                    | 46.7 ± 4.2                    | 0.38         | 0.001           | 0.85                     |             |  |
| MHC2A (%)                                       | 32.2 ± 5.8     | 37.7 ± 4.2     | 46.0 ± 2.9                    | 51.4 ± 4.1                    | 0.37         | <0.01           | 0.89                     |             |  |
| Hybrids (%)                                     | 0.0 ± 0.0      | 0.0 ± 0.0      | 1.3 ± 0.7                     | 1.9 ± 1.0                     | 0.79         | 0.02            | 0.79                     |             |  |
| <b>Insulin/glucose metabolism</b>               |                |                |                               |                               |              |                 |                          |             |  |
| pAKT serine 473/AKTtotal                        | 15.00 ± 8.04   | 15.03 ± 4.56   | 8.77 ± 2.69                   | 17.71 ± 5.56                  | 0.08         | 0.61            | 0.21                     |             |  |
| pGSK3α <sup>3</sup>                             | 2.91 ± 1.28    | 2.36 ± 0.92    | 1.74 ± 0.50                   | 2.88 ± 1.13                   | 0.14         | 0.61            | 0.19                     |             |  |
| pGSK3β  | 2.00 ± 1.09    | 1.44 ± 0.79    | 1.19 ± 0.48                   | 1.13 ± 0.45                   | 0.57         | 0.22            | 0.58                     |             |  |
| <b>Protein synthesis/degradation</b>            |                |                |                               |                               |              |                 |                          |             |  |
| atrogin-1                                       | 0.17 ± 0.08    | 0.20 ± 0.09    | 0.25 ± 0.10                   | 0.25 ± 0.12                   | 0.55         | <0.05           | 0.62                     |             |  |
| MURF-1  | 0.017 ± 0.004  | 0.016 ± 0.004  | 0.016 ± 0.003                 | 0.015 ± 0.002                 | 0.94         | 0.71            | 0.87                     |             |  |
| Ubiquitination                                  | 0.64 ± 0.06    | 0.36 ± 0.04    | 0.83 ± 0.08                   | 0.36 ± 0.05 <sup>**</sup>     | 0.01         | 0.1             | 0.09                     |             |  |
| HSP90   | 4.59 ± 0.26    | 4.26 ± 0.41    | 4.26 ± 0.34                   | 4.41 ± 0.70                   | 0.35         | 0.77            | 0.40                     |             |  |
| <b>Oxidative stress</b>                         |                |                |                               |                               |              |                 |                          |             |  |
| NRF2  | 6.52 ± 1.55    | 4.39 ± 0.62    | 4.99 ± 0.76                   | 5.28 ± 0.63                   | 0.68         | 0.50            | 0.45                     |             |  |
| Catalase  | 2.00 ± 0.84    | 1.20 ± 0.41    | 1.14 ± 0.28                   | 1.43 ± 0.38                   | 0.55         | 0.68            | 0.59                     |             |  |
| CBR1  | 4.13 ± 0.60    | 4.61 ± 0.78    | 4.55 ± 0.50                   | 4.30 ± 0.79                   | 0.52         | 0.97            | 0.41                     |             |  |
| AKR7A2  | 8.41 ± 0.59    | 8.51 ± 0.79    | 8.92 ± 0.63                   | 8.17 ± 0.83                   | 0.33         | 0.86            | 0.33                     |             |  |
| TNFα  | 3.55 ± 0.59    | 3.39 ± 0.61    | 2.97 ± 0.50                   | 3.60 ± 0.76                   | 0.21         | 0.52            | 0.19                     |             |  |
| <b>Mitochondria markers</b>                     |                |                |                               |                               |              |                 |                          |             |  |
| mitofusine                                      | 5.98 ± 0.77    | 6.14 ± 1.51    | 4.18 ± 0.96                   | 4.36 ± 1.15                   | 0.95         | <0.01           | 0.99                     |             |  |
| PGC-1α  | 0.37 ± 0.04    | 0.25 ± 0.02    | 0.38 ± 0.09                   | 0.20 ± 0.03                   | 0.21         | 0.65            | 0.64                     |             |  |
| Citrate synthase activity (μmol/min/mg protein) | 0.17 ± 0.03    | 0.14 ± 0.02    | 0.14 ± 0.03                   | 0.15 ± 0.03                   | 0.44         | 0.81            | 0.28                     |             |  |
| FATP1   | 3.50 ± 0.33    | 2.71 ± 0.39    | 3.34 ± 0.34                   | 3.40 ± 0.70                   | 0.07         | 0.45            | 0.07                     |             |  |

**Table 5: Vastus lateralis western blots and enzyme activity**

Means are ± SEM. <sup>1</sup>Mixed models are adjusted on baseline.

Post-hoc tests: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs control. #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 vs baseline.

Muscle fiber type : CSA: Cross Sectional Area; MHC: Myosin Heavy Chain; Western blots: pAKT: phosphorylated Protein Kinase B; pGSK3: phosphorylated Glycogen Synthase Kinase 3; MURF-1: Muscle-Ring-finger protein 1; HSP90: Heat Shock Protein 90; NRF2: Nuclear Factor erythroid-derived 2 like 2; CBR1: Carbonyl Reductase 1; AKR7A2: Aldo-Keto Reductase Family 7 Member A2; TNFα: Tumor Necrosis Factor α; PGC1α: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α; FATP1: Fatty Acid Transport Protein 1. Enzyme activity: citrate synthase.



# **Effect of an anti-oxidant dietary cocktail on metabolic flexibility induced by 60 days of bed rest in healthy male adults**

## **a. Resume**

In the perspective of the foreseen space missions to Mars and Moon, space agencies aim to understand the mechanisms leading to space deconditioning and develop countermeasure programs for long duration missions. A recent observation during bed-rest studies is the general storage of fat in tissues not specialized in fat storage, i.e. muscle, bone, liver, and whose function is altered because of this lipid accumulation even when energy balance is maintained. This general ectopic fat storage is thought to contribute to the development of metabolic syndrome in astronauts, which would jeopardize their health over the long-run. Recent studies conducted in the general population showed several nutrients taken individually, i.e. resveratrol, quercetin, omega-3 fatty acids, vitamins and others, partially prevent the development of metabolic features associated with metabolic diseases. In a feasibility study, we already showed that a cocktail composed of natural antioxidants XXS-2A (741mg), coupled with both omega-3 fatty acids (1g), vitamin E (168mg) and selenium (80µg) fully prevented the hypertriglyceridemia, the drop in fasting HDL and total fat oxidation as well as the increase in de novo lipogenesis induced by low levels of physical inactivity. From this new study, the objective is now to investigate the impact of simulated weightlessness and the new nutrient cocktail supplementation on human physiology during a long duration 6° head down tilt bed rest.

For this, twenty healthy male volunteers were randomly assigned to dietary antioxidant cocktail countermeasure (n=10) or isocaloric diet (n=10) during a 60-day head down tilt (HDT) bed-rest. Body composition, total energy expenditure and substrate oxidation as well as fasting and post-prandial blood chemistry were measured during baseline data collection (BDC) period, after nine days (HDT9) and after forty-nine days (HDT49) of bed rest during a day of metabolic challenge testing in the form of carbohydrate overnutrition during lunch and dinner.

Results showed that bed rest increased insulinemia and induced a hypertriglyceridemia as well as a shift in fasting substrate oxidation towards glucose oxidation. On the contrary, during the 24h study of postprandial metabolism, bed rest induced a decrease in postprandial glucose oxidation following larger insulin stimulation. More, bed rest gradually increased some pro-inflammatory indexes. All together these data pointed out the development of a metabolic inflexibility state that was also demonstrated through the use of specific metabolic indexes. On the other hand, results showed that cocktail supplementation prevented the alterations of lipid metabolism and the loss of anti-oxidant capacity induced by bed rest. It further maintained metabolic flexibility both over the short and long term. However, its beneficial effect was offsetted by the consumption of large oral load of both calories and carbohydrate. It also did not mitigate the development of insulin resistance and glucose intolerance. Because these latest are known to be protected by exercise countermeasures, future studies need to investigate the combination of both exercise and nutrient cocktail.

## **Effect of an anti-oxidant dietary cocktail on metabolic flexibility induced by 60 days of bed rest in healthy male adults**

### **Authors' names and affiliations :**

Anthony Damiot<sup>1\*</sup>, Donal J. O’Gorman<sup>2,13\*</sup>, John Noone<sup>2</sup>, Isabelle Chery<sup>1</sup>, Alexandre Zahariev<sup>1</sup>, Sylvie Normand<sup>4</sup>, Claire Laurens<sup>1</sup>, François Crampes<sup>5,6</sup>, Isabelle de Glisezinski<sup>7</sup>, Charlotte Cuerq<sup>4</sup>, Delphine Collin-Chavagnac<sup>4</sup>, Guillemette Gauquelin-Koch<sup>9</sup>, Michel Prost<sup>10</sup>, Chantal Simon<sup>8\*</sup>, Stéphane Blanc<sup>1\*</sup>, Audrey Bergouignan<sup>1,11,12\*</sup>,

\* These authors contributed equally to the work.

<sup>1</sup> Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France

<sup>2</sup> National Institute for Cellular Biotechnology & School of Health and Human Performance, Dublin City University, Ireland

<sup>3</sup> Université de Montpellier, INRA, UMR866 34060, Dynamique Musculaire et Métabolisme, F-34060, Montpellier, France

<sup>4</sup> Laboratoire de Biochimie CHLS 69310 Pierre Bénite, France

<sup>5</sup> INSERM, UMR 1048, Obesity Research Laboratory, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France

<sup>6</sup> Paul Sabatier University, Toulouse, France

<sup>7</sup> INSERM, UMR1048, Obesity Research Laboratory, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases and University of Toulouse, Paul Sabatier University and Toulouse University Hospitals, Departments of Clinical Biochemistry and Sports Medicine, Toulouse, France

<sup>8</sup> CARMEN, INSERM U1060/University of Lyon 1/INRA U1235 & CRNH-RA Lyon, France

<sup>9</sup> CNES, 75001 Paris, France

<sup>10</sup> Laboratoire de recherches appliquées Spiral/Kirial International, 21560 Couternon, France

<sup>11</sup> Anschutz Health and Wellness Center, Anschutz Medical Campus, Aurora, Colorado, USA.

<sup>12</sup> Division of Endocrinology, Metabolism and Diabetes, University of Colorado, Anschutz Medical Campus, Aurora, Colorado, USA.

<sup>13</sup> 3U Diabetes Consortium, Dublin City University, Ireland.

**Running Head:** Bed-rest-induced physical inactivity triggers metabolic inflexibility

### **Corresponding author:**

Stéphane Blanc

IPHC-DEPE

Centre National de la Recherche scientifique,

23 rue Becquerel

67087 Strasbourg, France.

Tel:+33609121847

E-mail : stephane.blanc@iphc.cnrs.fr

## ABSTRACT

**Context:** Actual and simulated microgravity triggers multiple adverse physiological and metabolic adaptations including muscle atrophy, the development of hypertriglyceridemia and insulin resistance, an inability to burn fat as fuel and metabolic inflexibility (i.e. the inability of the body to adjust fuel use to changes in fuel availability). These metabolic alterations are thought to result in a general ectopic fat storage. For decades, the International Space Agencies have tested exercise countermeasures to prevent these metabolic alterations. However, even very large volume of exercise training does not fully mitigate them. In this context, nutrition countermeasure has been attracting increasing attention. We showed that a dietary supplementation in anti-oxidant compounds prevents the alterations of lipid metabolism induced by physical inactivity in the general population, suggesting that nutrition countermeasure could have positive effects on astronauts' body during long term spaceflights.

**Objective:** The objective is to investigate the impact of simulated weightlessness on metabolic flexibility during 60 days of head-down bed rest (HDBR). The capacity of a nutrient cocktail composed of polyphenols, omega-3 fatty acids, vitamin E and selenium was also examined to prevent the expected deteriorations induced by physical inactivity.

**Design/Setting/Participants:** Twenty healthy male participants were randomly assigned to a dietary antioxidant cocktail countermeasure group (n=10) or an isocaloric diet group (n=10) during a 60-day HDBR protocol conducted at MEDES, Clinique de l'Espace (CHU Rangueil, Toulouse, France).

Body composition, total energy expenditure and substrate oxidation as well as fasting and postprandial blood chemistry were measured during baseline data collection (BDC) period, after nine days (HDT9) and forty-nine days (HDT49) of bed rest during an 18-hour metabolic challenge test.

**Results:** Bed rest increased insulinemia and induced a hypertriglyceridemia as well as a shift in fasting substrate oxidation towards glucose oxidation. On the contrary, during the 24h study of postprandial metabolism, bed rest induced a decrease in postprandial glucose oxidation following larger insulin stimulation. More, bed rest gradually increased some pro-inflammatory indexes. All together these data pointed out the development of a metabolic inflexibility state that was also demonstrated through the use of specific metabolic indexes. On the other hand, nutrient cocktail supplementation prevented the hypertriglyceridemia and anti-oxidant capacity but failed to prevent the loss in insulin sensitivity and inflammation. While it mitigated the development of metabolic inflexibility, its positive effect was overridden when large amounts of calories and carbohydrates were consumed.

**Conclusion:** This 60-day bed rest induced a shift in substrate use in favour of carbohydrate during fasting but a lower capacity to shift towards glucose following larger insulin stimulation, which indicate the development of metabolic inflexibility. Concomitantly, a low-grade inflammation state developed. Cocktail supplementation prevented lipid metabolism and anti-oxidant capacity and to a certain extent metabolic flexibility, but did not protected insulin sensitivity and glucose tolerance. Future studies need to investigate the combination of both exercise and nutrient cocktail to maintain both energy requirements and limit metabolic deteriorations occurring during both simulated and real weightlessness.

**New & Noteworthy:**

This is the first study to test the efficacy of a novel dietary nutrient cocktail on the metabolic and physiological changes occurring during 60 days of head-down tilt bed rest (HDBR)

The main findings of this study are that (i) HDBR leads to a shift in substrate use as well as a decrease in insulin sensitivity and total fat oxidation, hyperlipemia, a low-grade inflammation, all together leading to a decrease in metabolic flexibility; and (ii) a nutrient cocktail supplementation prevents the alterations on lipid metabolism and metabolic flexibility.

Keywords: Simulated microgravity, quercetin, omega 3 fatty acids, resveratrol, vitamins, insulin sensitivity, inflammation, nutrient oxidation

**Abbreviations:**

AUC: Area under the curve

BDC: Baseline data collection

BMI: Body mass index

DHA: docosahexaenoic acid

DRI: Dietary recommended intake

DXA: Dual energy X-ray

EPA: eicosapentaenoic acid

FM: Fat mass

HDBR: Head down tilt bed rest

HDL: Low density lipoprotein

HDT: Head down tilt

HMW: High molecular weight

LBM: Lean body mass

LDL: Low density lipoprotein

MET: Metabolic equivalent

MRI: Magnetic imaging resonance

mTOR: Mammalian target of rapamycin

MURF1: Muscle ring finger 1

NEFA: Non-esterified fatty acids

NPRQ : non-protein respiratory quotient

PAI1: Plasminogen activator inhibitor-1

PAL: Physical activity level

R+: Recovery

RMR: Resting metabolic rate

TG: Triglycerides

WHO: World health organization

## INTRODUCTION

International space agencies intend to begin a new era in human space exploration by planning new manned space flights to the moon and eventually to Mars. Physiological adaptations to space have been studied for more than 60 years at least for short duration flights but some gaps remained to guarantee a safe trip for longer missions than those experienced so far. Indeed, the absence of physical forces encountered in space microgravity alters the properties of essentially all organs and tissues [162]. On Earth, the most common and validated analogy of the human weightless environment is represented by the head-down bed rest (HDBR) model [113] to investigate the basic mechanisms of adaptation to short- or long-term physical inactivity in healthy subjects. [115]. Over the past 60 years, bed-rest studies ranging from as little as 3 days to 120 days have demonstrated that physical inactivity leads to changes in body composition such as a decrease in muscle mass, a decrease in bone mineral density, and an increase in fat mass [94, 112, 305, 306]. Muscle mass and fat mass changes contribute to an enhanced pro-inflammatory burden by affecting the normal crosstalk of metabolism regulating-hormones. While regular muscle contraction produces myokines-cytokines, which suppress pro-inflammatory activity [307] – adipose tissue produces a variety of pro-inflammatory mediators named adipokines that act both locally in the adipose tissue and systemically leading to low-grade inflammation [308] and oxidative stress [233-235]. Past studies also reported that muscle atrophy was associated with a shift from slow oxidative fibers towards fast glycolytic fibers [232]. There is also an increase in fasting and post-prandial glucose oxidation concomitant to an increased spillover of dietary lipids along with a reduced capacity to burn fat [138] even when energy balance is maintained (see [115] for review). The resultant hypertriglyceridemia is thought to be responsible for the ectopic fat storage observed in the liver, muscle and bone marrow [162]. This ectopic fat storage alters the function of these organs, and contribute to the development of tissue and whole-body insulin resistance [115]. Altogether, these adaptations have been shown to trigger metabolic inflexibility [115, 235].

Ground research using the bed rest model has yielded a better understanding of the mechanisms underlying the changes induced by microgravity. It also provides the best available means for evaluating countermeasure effectiveness needed to enable and ensure crew performance and safety on long duration missions [12] [165]. To date, a multitude of exercise countermeasures have been tested. However, even when large volume of exercise was prescribed, the exercise countermeasure was only partially effective. Future countermeasures for long-duration missions, for example an international mission to Mars, require an integrated approach to protect as many physiological systems as possible [9] without affecting non-targeted body functions. This has slowly shifter the efforts of research towards nutrition countermeasure that has the advantage, contrary to exercise, to not add strong burden on the astronaut's schedule. Recent studies conducted to develop preventive strategies suggest that bioactive nutrients such as polyphenols, vitamins and essential fatty acids may mitigate some metabolic features of physical inactivity. Momken et al. showed resveratrol restored soleus tetanic force as well as repartition between Myosin heavy chains on suspended rat model. Moreover, it partially re-establishes insulin sensitivity despite suspension [214]. In vitro supplementation with epicatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin gallate or quercetin on myotubes and myoblasts of mice under microgravity reduced the expression of MURF1 and Atrogin-1



ubiquitin ligases, known to be associated with muscular atrophy (Hemdan, Hirasaka et al., 2009). Otherwise, intramuscular quercetin injection also prevents muscular atrophy through inhibition of both MURF-1 and atrogen-1 pathways [213]. Servais et al. pointed out Vitamin E supplementation partially counteracted soleus atrophy in comparison to non-supplemented rats [205]. Regarding Omega-3 fatty acids, Zwart et al. demonstrated a negative correlation between the bone resorption biomarker N-telopeptide and the omega-3 fatty acid intake during bed rest [196]. Also, Smith et al. shown that an eight-week omega-3 fatty-acid supplementation helped to increase insulin sensitivity on healthy elderly population through a dependent mTOR pathway [200]. While fructose overfeeding led to an increase in fasting blood glucose, triglyceride levels, and *de novo* lipogenesis, fish oil supplementation reduced triglyceride levels and induced a reduction of *de novo* lipogenesis [201].

Literature from clinical studies have shown that taken together these micronutrients are having additive effects. Based on the literature, our team conducted a feasibility study to test the impact of a new nutrient cocktail composed of polyphenols,  $\omega$ -3 fatty acids, vitamin E and selenium on the metabolic and physiological changes that occur during 20 days of reduced daily steps and exercise in trained men. We showed that cocktail supplementation was able to prevent the lipid disorders induced by the step reduction as well as the development of a metabolic inflexibility state. Based on these encouraging results, the impact of this new anti-oxidant was proposed as a countermeasure to prevent the metabolic adaptations induced by 60 days of simulated weightlessness. We hypothesized that (i) 60 days of bed-rest would induce a shift in substrate oxidation towards glucose in both fasting and postprandial state, concomitantly with the development of an insulin resistance, a hypertriglyceridemia, an ectopic fat storage, and a low-grade inflammation leading to metabolic inflexibility; (ii) these metabolic alterations could be prevented by the nutrition countermeasure consisting in a daily supplementation of vitamins, omega 3 fatty acids, quercetin, resveratrol and vitamins combined in a cocktail. We further hypothesized the cocktail will more efficiently prevent short term than long term adverse metabolic effects of the bed rest.

## **METHODS**

### **Experimental design**

The present study tested the effect of antioxidant nutrient cocktail coupled with omega 3 fatty acids on several physiological systems during 60 days of head-down-tilt bed rest (HDBR). A first campaign was conducted from January to April 2017 on 50% of the subject; the second campaign was conducted from September to December 2017. The experimental schedule was broken down into three periods. A control period of 14 days (baseline data collection: BDC) was followed by 60 days at  $-6^\circ$  bed rest (HDT) and then 14 days of a recovery period (R+). The experiment outflow is presented in Figure 1. During the first (BDC) and last (R+) periods, subjects remained in the bed rest facility at MEDES, Clinique de l'Espace (CHU Rangueil, Toulouse, France). Volunteers were randomly assigned to daily nutrient cocktail supplemented (n=10) or control (n=10) groups. The participants, nurses and physicians were not blinded as no placebo pills were given to the control group; however, the statistician was blinded. The

study was approved by the Comité des Protections des Personnes Midi Pyrenées (NCT03594799).

### **Subjects**

Twenty healthy male volunteers (20-45 years, BMI = 19-27kg/m<sup>2</sup>) were recruited from the local community to participate in a 60-day bed rest study. Subjects' physical characteristics are presented in Table 1. All were in a good state of general health on the basis of medical history, physical and psychological examination, and routine urine and blood biochemical screening. None had a family history of diabetes mellitus or gastrointestinal disease or was taking any medication for 3 months before the study. The participants were fully informed of the purpose and potential risks of the experiment protocol. Subjects were included if they walk >10,000 steps/day, participated in at least two leisure sport sessions per week and were free of any known diseases. All participants provided a written informed consent. The study was in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the local ethical committee.

### **Physical activity during the baseline ambulatory period**

Habitual physical activity of subjects was objectively measured in free living conditions over a period of ten consecutive days by self-reported questionnaires and hip-worn triaxial accelerometer (Actigraph GT3x+™, Actigraph USA). Questionnaire contained questions concerning the type, frequency and duration of various activities in daily life, leisure time, work, and sport. Then, the different activities filled in by the subjects were subsequently coded into metabolic equivalents (MET). Accordingly, every activity-specific MET value was multiplied by the individual weekly amount of time spent on the activity. To assess the additional energetic cost of the physical activity, resting MET scores were subtracted from the total MET score, and a mean daily MET score was constructed [309].

To further quantify daily steps and intensity of activity, a hip-worn triaxial accelerometer (Actigraph GT3x+™, Actigraph USA) was used for 10 days about a month before the start of the bed rest. The accelerometer was taped to a stretch belt and hip-worn on the right iliac crest. Each subject received a logbook and was instructed to record specific activities or events. Physical activity level (PAL), defined as the ratio between daily total energy expenditure and resting metabolic rate (RMR) was estimated for each participant. RMR was estimated according to WHO equations. From the habitual PAL value and the estimated RMR, physical activity energy expenditure was estimated for each subject in order to develop an individual physical activity program. The goal of this training program was to maintain habitual physical activity of the subjects while they were staying at the space clinic in confined conditions during the baseline ambulatory period, and thus prevent any deconditioning prior to the bed rest. About 30% of individual habitual activity energy expenditure was expended while in the facility during structured exercise session, treadmill running or bicycling on an ergometer cycle. Each participant performed 4 walking/running sessions on a treadmill and 4 biking sessions on a bicycle over 8 days during the BDC period. The ergometer bike sessions were lasting 40 minutes. The running sessions started by a 5-minute warm-up walking at 5 km/h, followed by a 5-minute walking at 6 km/h, and about 30-minute running at 9 km/h. The exact duration of

the running bout and the bike resistance were adjusted for each individual so that the walking/running exercise session represented 30% of habitual activity energy expenditure. The remaining 70% of habitual activity energy expenditure were reached by walking in the facility. Participants were asked to reach about 8000 steps/day in order to guarantee a maximal shift in activity at the start of the bed-rest. Participants were equipped with a wrist-worn activity tracker bracelet (Polar Loop, Polar®, Finland) in order to record/save daily physical activity and have a real-time visual feedback. Investigators were checking the number of daily steps each day to help the participants reaching the targeted number of steps. Subjects were also asked to wear an ActiGraph on the hip at all time except during water-based activities to objectively measure their physical activity during the ambulatory control period.

## **Diet**

Diet was tightly controlled during the study by registered dieticians and provided by the MEDES. Participants were fed with conventional foods calculated to provide 1.2 g/kg/day of protein, 35% of energy as fat and the rest as carbohydrates. Energy intake was calculated to provide 1.67 calculated resting metabolic rate during the control and recovery periods and 1.33 during the best rest. Food ingested was weighted and energy ingested was calculated using the Nutrilog software (Version 3.11b). No extra food was allowed between the three daily meals taken at set times. All leftovers on the trail were weighted by the staff of the Metabolic kitchen. Daily nutrient intake is presented in Table 2.

## **Cocktail composition and doses**

The supplemented group received a polyphenol nutrient cocktail derived from food sources that consisted of Liliaceae, Vernenaceae, Lamiaceae, Vitaceae, Rubiaceae, Theaceae and Rutaceae Genres consisting of *Allium cepa*, *Lippia citriodora*, *Ajuga reptans*, *Vitis vinifera*, *coffea robusta*, *Camellia sinensis*, and *Citrus aurantium*. The cocktail is referred to as XXS-2A and was designed by Spiral Company (Dijon, France). The daily dose was achieved by the ingestion of six pills (two at breakfast, lunch and dinner) to reach a total dose of 741.0mg/d of polyphenols that was composed of 323,4mg/d flavonols (including quercetin 135mg), 78.0mg/d oligostilbens (including resveratrol 21mg), 96.0mg/d hydroxycinnamic acids (including chlorogenic acid 42mg), 135.6mg/d flavanols (including epigallocatechin gallate 60mg) and 108.0mg/d flavanones (including naringin 30mg). As there are no dietary references intake (DRI) available for polyphenols, the ~500 mg/d dose was based on several reviews on the bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans and others studies that tested the effects of polyphenols on exercise performance and oxidative stress [274-276].

The 3 g daily dose of  $\omega$ -3 fatty acids (Omacor, Pierre Fabre Laboratories, Toulouse France) was based on French pharmacopeia recommendations for hypolipemic effects (2-4 g/day) and was provided as a single pill per meal. This is within the daily dose used in most clinical studies [262, 263]. It corresponded of 1.1 g of eicosapentaenoic acid (EPA) and 1 g of docosahexaenoic acid (DHA). Vitamin E and selenium were given as a single daily pill providing 168 mg of vitamin E associated with 80  $\mu$ g of selenium (Solgar, Marne la Vallée, France). The DRI for Vitamin E is set at 15 mg/d. The tolerable upper limit (UL) for intake is set at 1 g in adults, therefore the dose from the commercially available pill was 6 times lower than the UL but 11 times higher than DRI. To capitalize on the cocktail effect, the dose of vitamin E was two-fold

lower than the doses that was previously reported to provide positive effects on metabolism and muscle [259, 269]. Regarding selenium, the intake reported in most countries presents a large variability. DRI and UL are respectively set at 55 µg and 400 µg per day. The selected dose provided a daily supplement that set the daily intake at 135 µg/d which is 3 times lower than the UL and lower than the dose reported in previous studies [259, 269]. The control group did not receive any supplementation or placebo.

### **Body composition**

Body mass, fat-mass (FM) and lean-body-mass (LBM) were measured after an overnight fast using a dual-energy X-ray absorptiometer (DXA, HOLOGIC QDR 4500W, USA) on before the bed rest, 4 days and 58 days after the start of the bed rest.

### **Muscle liver and subcutaneous fat content**

Muscles, liver and subcutaneous fat content were assessed by a 3T MRI (Hôpital Purpan, Toulouse, France) according to the Dixon I/O technique. MRI analysis were performed before and at the end of the bed rest. Calculations were done as previously described [310, 311].

### **Metabolic tests and substrate oxidation**

Metabolic tests were performed before (BDC), and after 9 (HDT9) and 49 days (HDT49) of bed rest. At BDC and HDT9, data measurements were realized until bedtime. At HDT9 measurements were stopped before dinner. The evening before the tests, participants ate a standard dinner (containing 42.5% carbohydrates, 33.3% lipids and 23.2% protein for a total of about 975 Kcal intake during BDC and 780 Kcal intake during HDT period). Twelve hours after the last evening meal and an overnight fast, tests began while participants were in the post absorptive state. Intravenous catheters were inserted into forearm vein for blood sampling. Following baseline collection, participants ingested a standard breakfast (8am), representing 20.5% of the daily energy individually-based requirements containing 78.1% carbohydrates, 12.6% lipids and 7.4% protein for a total 738Kcal intake in BDC and 649Kcal in HDT. A lunch (1pm) and a diner (6pm) were also served to the subjects. Those two meals were based on the standards dietary rules but were completed by a 25% overfeeding in the form of carbohydrates only to stimulate metabolic regulation. As shown in Figure 1, blood samples were sequentially collected every 30 or 60 minutes during 18 h to determine metabolic outcomes [non-esterified fatty acids (NEFA), glucose, triglycerides, pro and anti-inflammatory cytokines, blood anti-oxidant capacity, the size distribution of the lipoprotein subfractions] and hormone [insulin]. Blood was centrifuged immediately after being drawn at 3500 rpm and 4°C for 15 minutes, and plasma was then separated and frozen at -80°C until analysis.

Carbohydrate and fat oxidation rates were determined every hour using canopy dilution respirometry (Quark, Cosmed, Italy) and the classical equation of indirect calorimetry corrected for urinary nitrogen excretion [312, 313]. During the measurements, subjects were allowed to have their computer, phone and/or tablets, they were also allowed to read, and listen music while under constant supervision of one of the investigators; at no time they were allowed to sleep.

Blood and urine samples were collected at baseline and for 18h. Gas exchange by indirect calorimetry was performed for 20 minutes every hour and urinary nitrogen excretion was used to measure non-protein respiratory quotient (NPRQ), total carbohydrate and lipid oxidation.

### **Blood and urine samples analyses**

Plasma glucose (ABOTT), NEFA (WAKO), triglycerides (RANDOX) and insulin (ROCHE) were measured by colorimetric assays and chemiluminescence methods, as previously described [314]. The ratio between low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol was determined by polyacrylamide gradient electrophoresis (SPIRAGEL® 1.5-25%). The urine was analyzed for nitrogen content according to the Dumas method (RapidN Cube, Elementar, Germany).

### **Inflammation & oxidative stress**

Pro- and anti-inflammatory adiponectin, adiponin, lipocalin, resistin and PAI1 and anti-oxidative capacity responses were investigated in fasting state during the days of our test. Measurements were done using a milliplex human adipokine magnetic bead panel 1 kit according to the supplier's instructions and based on Luminex technology. Plates were read on a bioplex 200 (Biorad) and results were analysed by the use of Bio-plex Manager™ software. Subject plasma antioxidant capacity was evaluated using *in vitro* free-radical-induced blood hemolysis KRL KRL and RESEDA tests (Kirial International/Spiral, Couternon, France). Blood sample is tested and the time until 50% of the red blood cells are lysed is measured. The result is representative of the global antioxidant capacity of a subject. Similarly, RESEDA test is measuring antioxidant defences after the action of three different hydrolases: glucosidase (R1), sulfatase (R2), glucuronidase (R3) on anti-free-radicals' groups as previously described [284].

### **Data and statistical analysis**

Metabolic responses during metabolic tests were presented as area under the curve post meals (AUC). Data measurements were realized until bedtime on both BDC-10 and HDT49 while HDT9 measurements were stopped before dinner. We decided to represent AUC over 10 hours of test (AUC<sub>10h</sub>), which allowed to consider HDT9 values and so short-term effects of bed-rest (BDC vs HDT4 vs HDT48). Moreover, AUC over 14 hours (AUC<sub>14h</sub>) are also presented in order to show the differences caused by long-term effect (BDC versus HDT49). AUC were presented for plasma glucose, insulin, NEFA, TG as well as carbohydrate & lipid oxidation and non-protein respiratory quotient (NPRQ). Changes in fasting metabolites, hormones and substrate oxidation are presented in delta (fasting<sub>24h</sub> – fasting<sub>0h</sub>) as the changes following 24-hour carbohydrate overfeeding. Metabolic flexibility was assessed during three days of testing during the control period (BDC-10), during the early phase (HDT9) and the late phase of HDT (HDT49). Metabolic flexibility was calculated as the delta of both glucose, insulin, carbohydrate & lipid oxidation and NPRQ, by subtracting the fasting state value to the maximal value obtained after each meal during each day of lipid test [174].

The effects of the bed rest and the cocktail supplementation on the outcomes were assessed by using mixed linear models taking repeated measurements among subjects into account among subjects with group, intervention, group-by-intervention interaction and baseline values as fixed effects; . Additional adjustment for FM and LBM was performed for substrate oxidation.

Between-group differences were assessed by using post-hoc tests at each time point. Data obtained during the 14-hour postprandial lipid test are presented as area under the curve (AUC). Significance was set up at 0.05 for main effects and 0.10 for interaction effects. Values are mean or AUC  $\pm$  SEM. Statistical analysis were performed with SAS version 9.4 (SAS Institute, Cary, USA).

## **RESULTS**

### **Physical characteristics**

Baseline participants characteristics as well as changes in body weight and body composition induced by the bed rest are presented in Table 1. Bed-rest significantly decreased body mass due to a significant decrease in LBM, which was associated with muscular atrophy as indicated by the quadriceps atrophy (Table 3). A significant increase in FM was observed of about 1kg over the 60-day intervention which was associated with a rise in the percentage of FM (Table 1). This indicates the subjects were in positive energy balance during the bed rest. Concomitantly, changes in fat deposition were observed (Table 3). Bed-rest induced an increase in both intra-abdominal fat and leg subcutaneous fat according. The supplemented group displayed a greater increase in intra-abdominal fat content than the control group. Contrary to our hypothesis, bed-rest did not induce intra-hepatic and intra-muscular fat accumulation nor an increase in belly subcutaneous fat. No differences were observed for these parameters between the groups.

### **Fasting glucose tolerance, lipemia, cholesterolemia, insulin sensitivity and substrate oxidation**

Fasting plasma insulin was neither affected by the bed-rest nor by the cocktail supplementation (Figure 2). However, while fasting plasma glucose decreased with the bed rest, the supplementation maintained concentration at baseline levels. Bed-rest significantly decreased fasting NEFA concentrations but increased fasting triglycerides concentration (Figure 2). While the cocktail supplementation did not influence NEFA concentrations, it prevented the increase in fasting triglyceridemia induced by 60-day of bed-rest. Bed-rest also dropped both fasting cholesterol and HDL concentrations (Table 4). While the cocktail supplementation did not prevent the decrease in cholesterol, it led to a more pronounced decrease in HDL concentrations. Concerning the lipoproteins fractions and size, bed-rest induced a decrease in LDL maximal size, both HDL1 and HDL2b percentage, and an increase in LDL/HDL ratio, and both of HDL3a and HDL3b percentage. Interaction effects between bed-rest and the cocktail supplementation were significant for HDL2a HDL2b and HDL3c percentages. In the supplementation group, HDL2a percentage remained stable and HDL2b percentage increased during the bed rest period; HDL3C increased up to HDT9 and then decreased from HDT9 to HDT49.

Although bed-rest did not induce significant changes in fasting carbohydrate oxidation (Figure 2), it induced a significant drop in fasting lipid oxidation (Figure 2) and a significant increase in fasting NPRQ (Figure 2). No interaction of bed-rest with cocktail supplementation was noted for nutrient oxidation.

### **Postprandial metabolic responses following 10-hour and 14-hour test meals**

Looking at the postprandial responses to breakfast and lunch ( $AUC_{10h}$ ) and breakfast, lunch and dinner ( $AUC_{14h}$ ), both short period (9 days) and long period (49 days) of bed-rest induced a decrease in glucose AUC and an increase in insulin AUC (Figure 3). Bed-rest further induced a gradual decrease in postprandial carbohydrate oxidation considering the response to dinner ( $AUC_{14h}$ ) or not ( $AUC_{10h}$ ) (Figure 4). The cocktail supplementation did not impact glucose metabolism, i.e. postprandial glucose, insulin or glucose oxidation. Simultaneously, bed-rest induced a significant decrease in both postprandial NEFA and TG concentrations regardless of the time-frame considered ( $AUC_{10h}$  or  $AUC_{14h}$ ) (Figure 3). Surprisingly, neither postprandial lipid oxidation nor NPRQ were affected by the bed-rest regardless of the duration (9 d and 49 d) and the number of meals considered ( $AUC_{10h}$  and  $AUC_{14h}$ ) (Figure 4). The supplementation had no effect on NEFA concentration, lipid oxidation and NPRQ. It however led to a more pronounced decrease in postprandial TG in the supplemented group than in the control group.

### **Metabolic flexibility**

Metabolic flexibility was assessed during the days of metabolic challenge through a chosen index expressed as a delta of both, insulin, glucose, NEFA, TG, carbohydrate & lipid oxidation and NPRQ, by subtracting the fasting state value to the maximal value obtained after each meal. To increase readability of the results, we decided to present the delta ( $Max_{post\ meal} - fasting$ ) for each meal of our test for NEFA, TG and insulin (Figure 5) and substrate oxidation (Figure 6). In response to the eucaloric high carbohydrate (EU/HC) breakfast, delta concentrations of insulin, glucose and TG were not modified with bed rest, regardless of the duration (Figure 5). However, delta NEFA concentrations dropped from BDC-10 to HDT9 and increased from HDT9 to HDT49 in both groups. Bed-rest induced an increase in delta lipid oxidation and a decrease in both NPRQ and carbohydrate oxidation at least after 9 days of bed rest (Figure 6). Over the long-term, these changes were not maintained but slightly reversed. No significant treatment or interaction effects were observed on delta insulin, glucose, NEFA and TG concentrations. Nonetheless, the cocktail supplementation significantly mitigated the changes induced by the bed rest on delta NPRQ, carbohydrate and lipid oxidation. After 49 days of bed rest, the supplemented group had a delta in lipid oxidation value similar to that measured in ambulatory baseline conditions. Altogether, these data are showing that in response to a eucaloric high carbohydrate standard meal, bed rest leads to a reduced ability to shift the use of nutrients as fuel from lipid oxidation in fasting state to carbohydrate in postprandial conditions, which indicates the development of a metabolically inflexible status. Interestingly, bed-rest-induced metabolic inflexibility was prevented by the cocktail supplementation especially over the long-run.

In a second part of this metabolic test, participants were provided with a hypercaloric high carbohydrate (overfeeding, OF/HC) lunch at all time points of the bed rest. Bed-rest induced a gradual drop in both delta glucose and TG concentration and an increase in delta insulin concentration (Figure 5). Of note, delta in insulin, i.e. the response of insulin to the glucose load, was not modified after 9 days of bed rest, but was significantly increased after 49 days of bed rest. No changes in the response of NEFA to the meal was observed with bed rest. The supplementation had no impact on the metabolic responses to the OF/HC lunch except a greater decrease in delta TG concentration. Similarly, to what we observed in response to the EU/HC

breakfast, delta lipid oxidation increased and delta carbohydrate oxidation, and QRNP decreased between BDC-10 and HDT9 but then plateaued and remained stable between HDT9 and HDT49 (Figure 6), suggesting that all changes occurred in the first days of bed rest. Whereas no treatment or interaction effect was observed on both NPRQ and carbohydrate oxidation, the increase in delta lipid oxidation was present at HDT 9 but was reversed after 49 days.

At baseline and after 49 days of bed rest, participants also received a OF/HC dinner. Changes in delta metabolites, insulin, carbohydrate oxidation (Figure 5), lipid oxidation and NPRQ (Figure 6) were all similar to what was observed following the OF/HC lunch between BDC-10 and HDT49. Similarly, the cocktail supplementation prevented the bed-rest induced increase in delta lipid oxidation and exaggerated the decrease in delta TG concentrations. Surprisingly no effect was observed on carbohydrate oxidation.

Considering that breakfasts were standard while volunteers were overfed during lunch and dinner, these results confirmed the fasting observation that insulin rose gradually during the time course of the bed-rest, as it is clearly observable when expressed as area under the curve after ingestion of both overfed-lunch and -dinner. During the bed-rest, an increasing amount of insulin is required to trigger a progressively lower shifting capacity to oxidize glucose, thus supporting the development of a metabolic inflexibility that was even more highlighted under overfed conditions. Cocktail supplementation didn't prevent from the development of metabolic inflexibility but was found effective to protect against acute and chronic hypertriglyceridemia following carbohydrate overfeeding.

Altogether, these results are showing that even in presence of elevated insulin concentration in response to standard meals, the ability of shifting from fat to carbohydrate oxidation in response to increased carbohydrate intake is diminished within the first days of bed rest. This inability was observed regardless of the carbohydrate load. Over the long run some mechanisms were developed that allowed the organism to adjust carbohydrate and lipid oxidation to increased carbohydrate intake. However, this was seen as long as the caloric intake was close to the energy needs. Overfeeding with the extra calories been provided as carbohydrate overrode the system, and the organism was no longer able to increase carbohydrate oxidation to match the large load of carbohydrate, showing the limitations of the metabolic adaptations to bed rest over the long run.

### **Changes in fasting metabolites and substrate oxidation following 24h carbohydrate overfeeding**

Fasting metabolites, insulin and substrate oxidation were compared between the morning prior to carbohydrate overfeeding and the following morning to examine the metabolic response to 24h of carbohydrate overfeeding (Figure 7). Following one day of carbohydrate overfeeding, bed-rest only induced a drop in delta TG concentrations. The treatment did not significantly mitigate bed-rest effects excepted for delta HDL concentrations for which a increase between BDC-10 and HDT9 was observed, in supplemented group while a decrease was found in the control group. Between HDT9 and HDT49 delta HDL in both groups returned to baseline values. These results indicate that one day of metabolic challenge was well tolerated during the time course of the bed rest without negatively affecting metabolites responses and substrate



oxidation. Nonetheless, short term bed-rest effect induced a drop in delta HDL concentrations that was prevented by the supplementation. However, cocktail supplementation failed to prevent drop in delta HDL against the chronic long-term effect of bed-rest.

### **Inflammation and anti-oxidant capacity**

Fasting inflammatory resistin, lipocalin and PAI1 concentrations remained unaffected by either the bed-rest or the supplementation (Table 5). On the contrary, bed-rest induced a decrease in fasting adiponectin concentrations as well as a decrease in fasting adiponectin between BDC-10 and HDT9 which was then increased between HDT9 and HDT49 although it did not reach baseline values. Moreover, bed-rest induced an increase in oxidative stress marker KRL between BDC-10 and HDT9 followed by a reduction between HDT9 and HDT49. It further reduced the blood antioxidant capacity as expressed by a drop in RESEDA R2 between BDC-10 and HDT9 and an increase between HDT9 and HDT49. No interaction effects between bed-rest and cocktail supplementation was found for these parameters (Table 5).

Furthermore, we also investigated the changes in inflammation and oxidative stress markers following one day of carbohydrate overfeeding (Figure 8). Delta adiponectin, lipocalin and PAI1 concentrations remained unaffected by either bed-rest or supplementation. Besides, bed-rest increased delta resistin and adiponectin concentrations over the time course of the study. Changes in delta resistin were noticed in acute response to bed-rest while increase in delta adiponectin was only seen in response to chronic effect of the bed-rest. No interaction with cocktail supplementation was observed for these latter. Regarding the blood antioxidant capacity, intervention induced an increase in RESEDA R2 and R3 from BDC-10 to HDT9 and a decrease from HDT9 to HDT49. No interaction with cocktail supplementation was noted. The nutritional countermeasure induced an increase in KRL (%) between BDC-10 and HDT9 which was then reduced between HDT9 and HDT49 in the supplemented group while KRL (%) slightly dropped from BDC-10 to HDT49, while No bed-rest or interaction were observed.

During the bed rest, fasting adiponectin concentrations dropped in both groups. A significant drop in adiponectin was noted. Moreover, bed-rest tended to increase pro-inflammatory indexes after one day of carbohydrate overfeeding over the time course of the bed rest, especially for resistin and adiponectin. Cocktail supplementation did not protect against the drop in both fasting adiponectin and adiponectin in response to both acute and chronic bed-rest adaptations. Finally, we also investigated the blood-antioxidant capacity after one day of carbohydrate overfeeding. Results showed that bed-rest had the tendency to increase blood-antioxidant capacity, especially for KRL (%) and RESEDA R1, in response to one day of carbohydrate overfeeding, without reaching significance. According to delta RESEDA R2 and R3, it seems that bed-rest induced an acute increase in blood antioxidant capacity which are then reduced during the prolongation of the bed rest period. Despite, cocktail supplementation seemed to improve blood-antioxidant capacity after carbohydrate overnutrition when compared to control group at least in response to acute bed-rest adaptations.

## **DISCUSSION**

The first objective of this study was to investigate the impact of a 60-day anti-orthostatic bed-rest on metabolic flexibility and ectopic fat storage. Based on fasting measurements, we have demonstrated that physical inactivity induced by 60-day of anti-orthostatic bed-rest induced a

shift in fasting substrate oxidation from lipid oxidation towards carbohydrate oxidation. This shift was associated with an increase in cholesterol and triglycerides as well as a change in lipoprotein fraction distribution. While only slight changes were noticed under fasting condition, standard breakfast ingestion and a metabolic challenge represented by carbohydrate overfeeding during lunch and dinner unveiled the development of metabolic inflexibility. Indeed, we observed that the metabolic challenge by carbohydrate overnutrition pointed out an incapacity to increase post-prandial carbohydrate oxidation following higher insulin stimulation. In addition, with an increased fasting glucose oxidation, these overall results have to be linked with insulin-resistant overweight subjects in which this situation is typically observed. We also focused on metabolic flexibility status over one day of metabolic challenge by carbohydrate overfeeding. Metabolic flexibility indexes used after both breakfast, lunch and dinner revealed that an increasing insulin concentration is required over time to trigger a progressively lower shifting capacity to oxidize glucose. These results emphasize the development of a metabolic inflexibility state during bed-rest. Of note, metabolic inflexibility is likely to occur as soon as 9 days of head-down tilt bed-rest showing the development of an acute metabolic inflexibility that is then maintained during the time course of the bed-rest. Thus, in addition to acute metabolic inflexibility, chronic metabolic inflexibility state was also clearly highlighted after 49 days of bed-rest. Furthermore, this supports our hypothesis that physical inactivity and sedentary behaviors are determinants of metabolic inflexibility [115, 171].

Increase in inflammatory and anti-oxidant responses are associated with metabolic risk factors [315, 316] and may contribute to the development of several comorbidities, including insulin resistance and type II diabetes [317, 318]. Thus, we also investigated inflammatory and anti-oxidant capacity following 60 days of anti-orthostatic bed-rest. Adiponectin, an adipokine known to stimulate insulin sensitivity and reduce inflammation, and adipisin, another adipokine known to act at least in part to potentiate insulin secretion, especially when glucose levels are elevated [319], dropped in both groups during the time course of the bed-rest. These results could explain at least in part the loss in insulin sensitivity noticed during the bed-rest. Besides, bed-rest had the tendency to increase blood anti-oxidant capacity.

Of note, some of the changes were detected as soon as after nine days of anti-orthostatic bed-rest (fasting adiponectin and adipisin, fasting RESEDA R2, delta resistin) as acute effect of bed-rest while some others (delta adipisin) were only noticed after 49 of anti-orthostatic bed-rest as chronic effect of bed-rest.

Furthermore, we wanted to study the impact of an anti-inflammatory nutrient cocktail supplementation to counteract the bed-rest adaptations. The nutrient cocktail supplementation used as a countermeasure during the 60-day bed-rest was based on results previously obtained from a pilot study used to test the efficacy of cocktail supplementation during a 20-day free-living enforced-physical inactivity coupled with high dose of fructose-glucose ingestion conducted in 2015 on 20 healthy males. The anti-inflammatory and antioxidant cocktail supplementation had no effect under fasting condition besides a clear mitigation of hypertriglyceridemia. Even following a metabolic challenge by carbohydrate overfeeding, cocktail supplementation didn't allow protection on bed-rest-induced adaptations with the only exception to induce a greater reduction of hypertriglyceridemia in response to both acute and chronic bed-rest adaptation in comparison to control group.

As expected, bed rest induced muscle atrophy, insulin resistance, hypertriglyceridemia and metabolic inflexibility. However, contrary to our hypothesis, these metabolic alterations were not associated with an ectopic fat storage in the liver and muscle. This is even more surprising that subjects were in positive energy balance. Some changes in the tissue partitioning of the fat was however observed with an increase in fat accumulation in intra-abdominal and subcutaneous fat tissue while subcutaneous adipose tissue was not increasing. Of note these results are in agreement with a study that showed that with bed rest subcutaneous adipose tissue can no longer handle fat uptake and fatty acids are stored in intra-abdominal adipose tissue [320].

As highlighted by metabolic flexibility indexes, cocktail supplementation did not protect against the development of insulin resistance over the time course of the bed rest. However, supplementation prevent the development of an acute metabolic inflexibility but only in response to an eucaloric breakfast. Indeed, some mechanisms were developed that allowed the organism to adjust carbohydrate and lipid oxidation to increased carbohydrate intake. However, this was seen as long as the caloric intake was close to the energy needs. Overfeeding with the extra calories been provided as carbohydrate overrode the system, and the organism was no longer able to increase carbohydrate oxidation to match the large load of carbohydrate, showing the limitations of the metabolic adaptations to bed rest over the long run. Thus, supplementation appeared efficient to counteract at least partially acute metabolic inflexibility as long as the caloric intake matches energy needs. Over the long run, supplementation is no longer efficient to counteract chronic metabolic inflexibility. Otherwise, as revealed in fasting state, cocktail supplementation protected against the rise in triglyceridemia following carbohydrate overnutrition. Finally, the choice has been made to use an anti-inflammatory and anti-oxidant nutrient supplementation based on previous studies and reviews that highlighted the impact of anti-inflammatory compounds on insulin sensitivity and metabolic flexibility [239-242, 244]. While blood antioxidant could adapt to an acute period of bed-rest, chronic physical inactivity induced by 49 days of bed-rest finally decreased blood anti-oxidant capacity. Cocktail supplementation seemed to prevent from changes in blood anti-oxidant capacity at least during the first days/weeks of bed-rest but were not sufficient in the long-term.

Altogether, these results emphasize the development of a metabolic inflexibility due to an accumulation of metabolic dysfunctions caused by physical inactivity. Most of the metabolic adaptations caused by 60-day of anti-orthostatic bed-rest are difficult to spot in fasting state but are unveiled under acute positive energy balance by carbohydrate overnutrition. From these data arise the importance of adequate energy supply in terms of energy balance and diet composition. Based on recent publications demonstrating the effect of polyphenols such as quercetin, resveratrol, cinnamon, grape or green tea extracts on insulin sensitivity, lipid metabolism, inflammation and oxidative stress [239-246], a micronutrient supplementation could be of interest to mitigate the deleterious consequences of real or simulated weightlessness. Interestingly, the notion of nutrients cocktails is emerging and could provide additive effects or synergistic effects between micronutrients. Some studies already showed that co-supplementing with  $\omega$ -3 & green tea extracts [267],  $\omega$ -3 & vitamin E [226, 268], vitamin E & selenium [269], fish oil & selenium [270], epigallocatechin & resveratrol [271] improve, to some extent, insulin sensitivity, body composition, fat oxidation, inflammation and oxidative

stress in aging and diseases associated with muscle atrophy including obesity and type 2 diabetes. Nonetheless, to date, our study is the first to investigate the impact of an anti-inflammatory and antioxidant nutrient cocktail as a countermeasure during a 60-day anti-orthostatic bed-rest study. While no similar data exist in that specific case, numerous recent studies investigating the impact of various dietary supplementation, in different physiopathological states and models, support the hypothesis that a dietary supplementation could be beneficial on numerous systems without negatively affect non-targeted organs and systems [79, 214, 218, 224-226]. For now, cocktail supplementation protects from a rise in hypertriglyceridemia, counteracts the development of an acute metabolic inflexibility in absence of carbohydrate overfeeding by maintaining lipid oxidation. Also, cocktail supplementation tends to prevent from changes in blood antioxidant capacity.

Interestingly, previous studies have shown that exercise maintained insulin sensitivity and carbohydrate metabolism [139, 140]. Meex et al. also shown that both aerobic and resistive exercise training improved both muscle, hepatic and adipose tissue insulin sensitivity concomitant with the restoration of mitochondrial function and metabolic flexibility in type II diabetic patients [321]. Thus, the combined use of exercise countermeasure and dietary cocktail supplementation could benefit additive and synergistic effects in order to counteract both short and long-term bed-rest adaptations.

Of note, the main effect of the cocktail triglyceridemia could be accounted for the specific role of polyphenols and omega-3 fatty acids that composed the supplementation. Indeed, Smith et al. have shown that omega-3 supplementation alone reduced triglyceridemia as well as de novo lipogenesis [200]. Also, Annuzzi et al. pointed out an improvement in post-prandial TG and triglyceride-rich lipoproteins with a diet naturally enriched in polyphenols [295]. Otherwise, the cocktail supplementation didn't protect against oxidative stress induced by bed rest. While different studies showed an impact of vitamin E [203, 207] and polyphenols [204, 212-214], some others failed to demonstrate an impact of vitamin E [206] or polyphenols, in particular resveratrol supplementation [322-324], on oxidative stress in humans. Then, further studies are needed in order to understand the underlying mechanisms involved between inflammation and insulin sensitivity and metabolic flexibility. Also, new studies are required to better understand the impact of dietary cocktail supplementation to counteract the metabolic adaptations induced by physical inactivity.

This study showed some strengths by a combined assessment of ectopic fat storage through MRI, the measurements of metabolic responses following both eucaloric and overfeeding meals. Also, 60 days of bed-rest allowed us to compare short- and long-term adaptations.

Nonetheless, some limitations need to be pointed out. First of all, the study had two distinct groups but the control group did not take a placebo supplementation due to difficulties to find a neutral oil to encapsulate. Moreover, we failed to maintain energy balance as subjects were in positive energy balance, particularly supplemented group. This situation could explain the increased intra-abdominal fat observed in supplemented group. Studies already showed that positive energy balance coupled to physical inactivity accelerated the metabolic adaptations under microgravity [112]. Compared to the previous study, the cocktail composition and dose was different during the bed-rest. Indeed, the total dose of polyphenols was increased by 211,5mg/d in comparison to the pilot study. Otherwise, selenium, vitamin E and omega-3 doses were not changed between the studies.

## **CONCLUSION**

In summary, our results indicate that physical inactivity induced by 60-day of anti-orthostatic bed-rest triggers metabolic inflexibility, while subjects were in positive energy balance. These data abet to spotlight the role of simulated microgravity-induced physical inactivity in metabolic inflexibility. Thus, evidence from this bed-rest would benefit for long-term missions scheduled in the years to come but are also to be associated with the growing sedentary individuals in the westernized society. Besides, the anti-inflammatory and antioxidant nutrient cocktail supplementation did not protect against ectopic fat storage or muscle atrophy but prevent at least partially from short- and long-term metabolic inflexibility, triglyceridemia and oxidative stress reduction. Further studies are needed in order to reveal the underlying mechanisms implied in the onset of whole-body metabolic flexibility and the link between inflammation and insulin resistance at least. As the lack of physical activity seems to be the main trigger of metabolic inflexibility and because the exercise countermeasure is known to protect against insulin resistance, a combination of dietary supplementation and exercise could be of real interest to trigger the beneficial effects from both countermeasures.

**Acknowledgements**

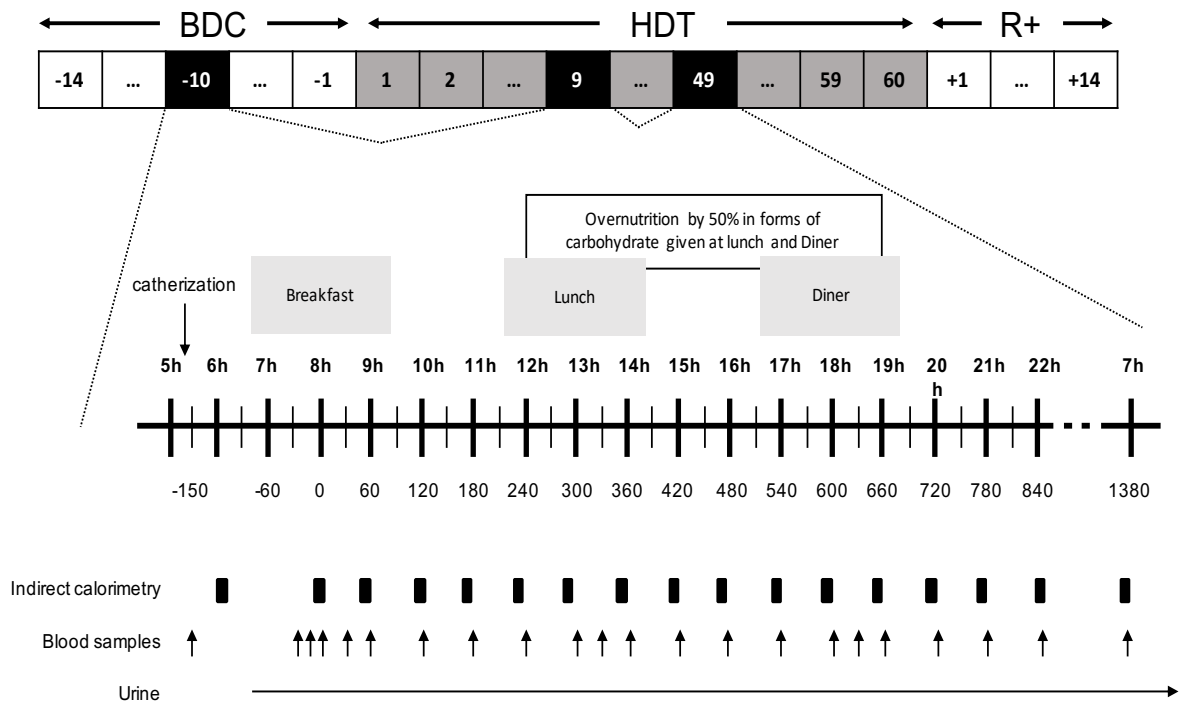
We are thankful to the participants and the medical, nutrition and administrative staff of the MEDES – Institut de Médecine et Physiologie Spatiale.

**Funding:** This work was supported by grants from the CNRS and from the European (ESA) and French (CNES) Space Agencies. AD and RD are supported by graduate fellowships from CNES.

**Clinical trial registration:** NCT03594799

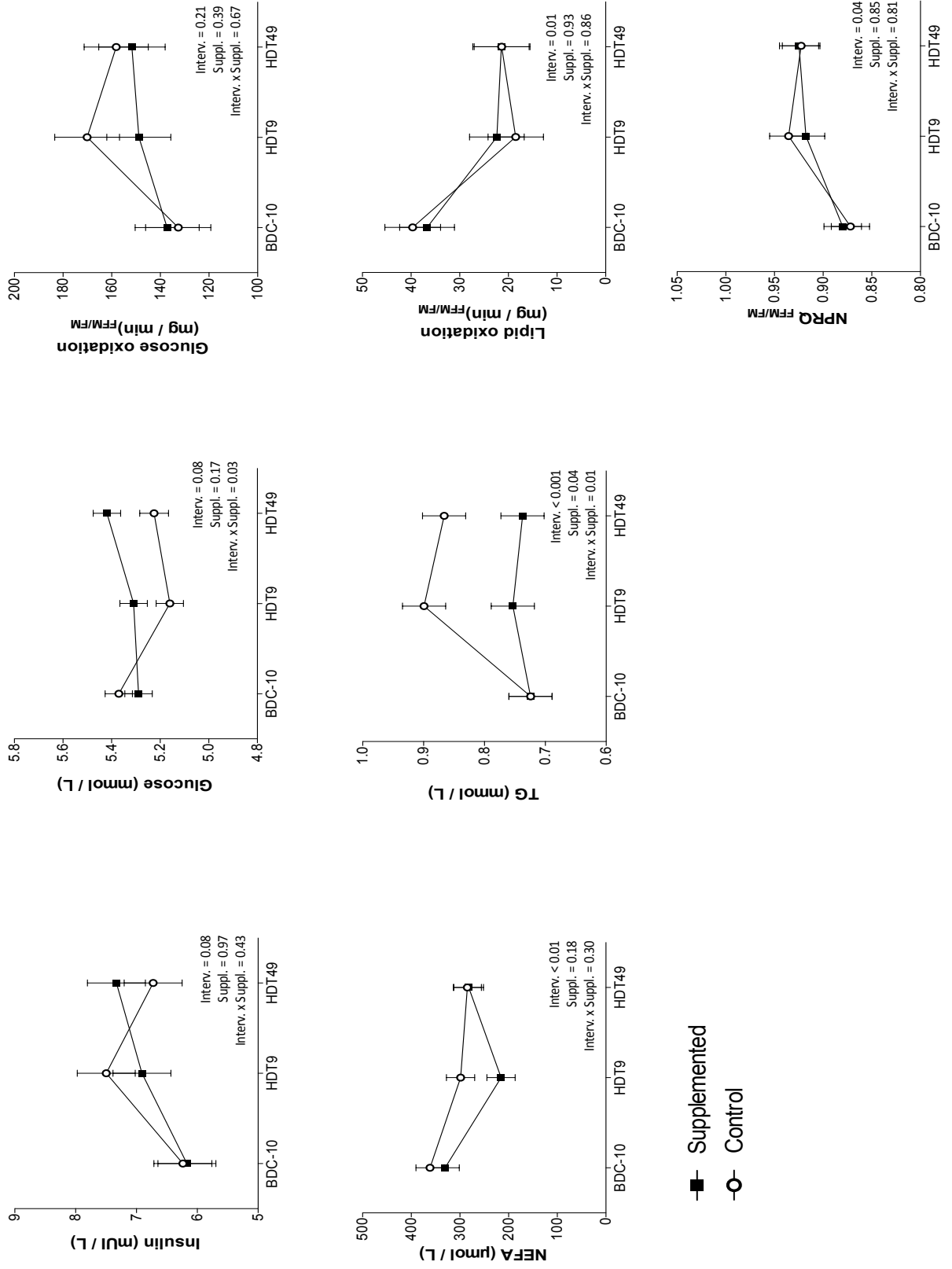
**Disclosure summary**

Michel Prost, director of Spiral company developed the cocktail XXS-2A to market it if efficient.



**Figure 1: Design of the study**

## Fasting parameters





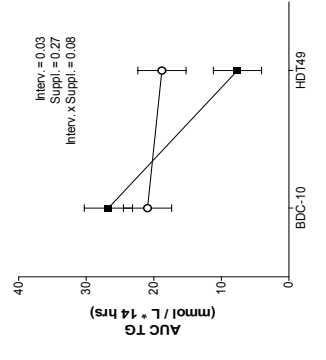
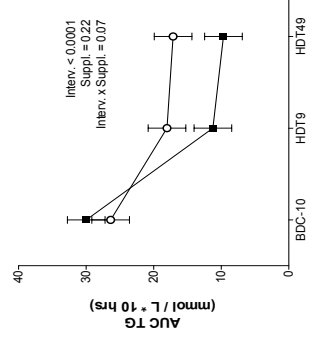
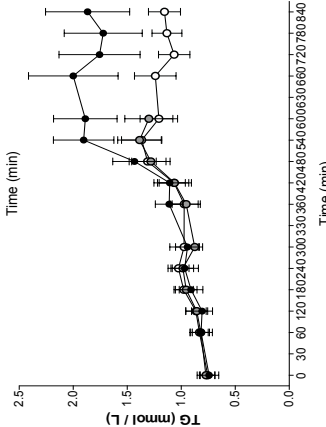
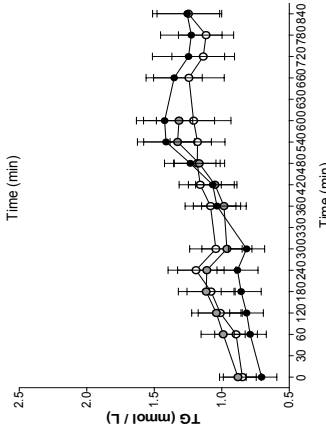
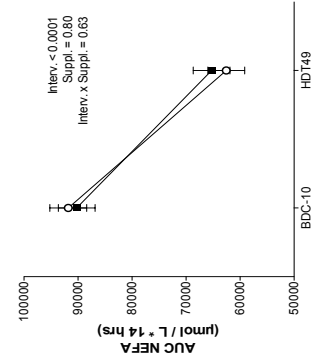
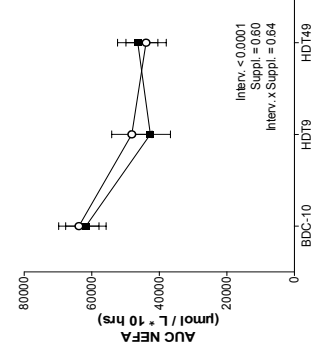
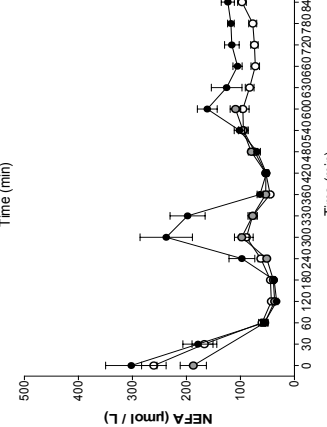
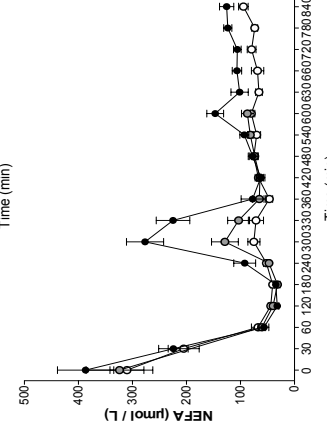
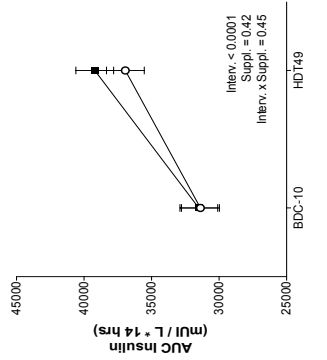
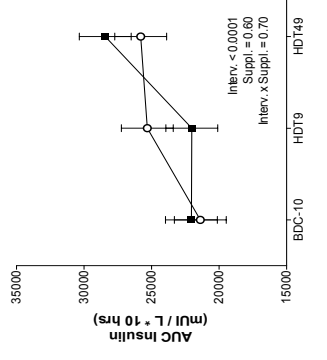
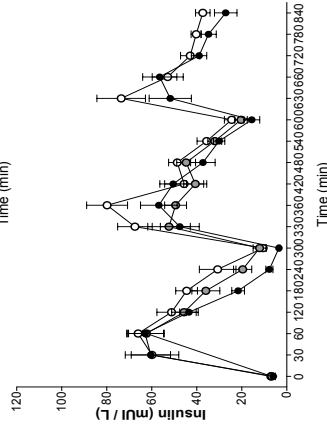
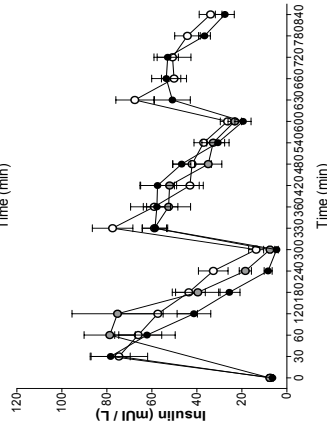
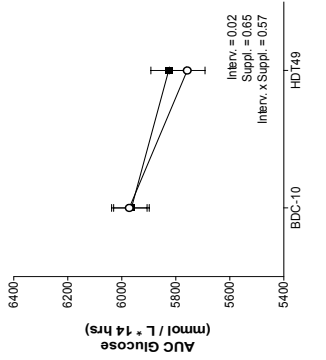
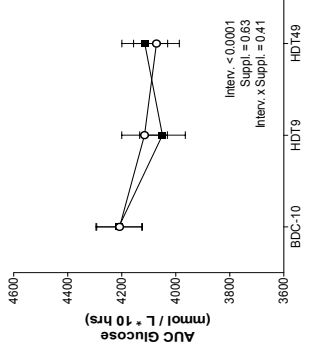
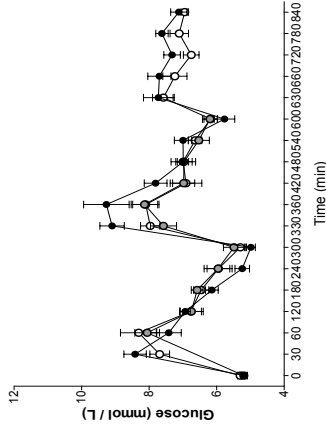
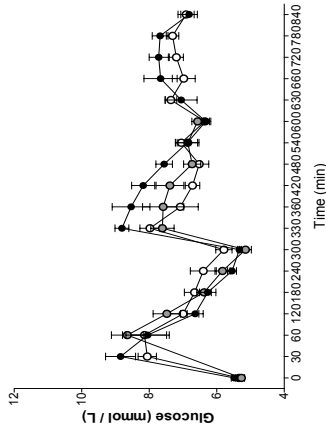
**Figure 2: Fasting plasma insulin, glucose, NEFA, TG concentrations and fasting substrate oxidation during the metabolic tests**

Plasma insulin, glucose, NEFA, TG concentrations in fasting state during the time course of the bed rest between BDC-10, HDT9 and HDT49. Reported data have been adjusted for baseline. Oxidation data are adjusted on fat mass (FM) and fat-free mass (FFM). Results of the linear mixed model analysis are displayed on the figure with p-value for intervention (Interv.), cocktail supplementation (Suppl.) and the supplementation-by-intervention interaction (Interv. x Suppl.). Values are LSMMeans  $\pm$  SEM.

**kinetics Control**

**AUC: breakfast to pre-dinner**

**AUC: breakfast to pre-bedtime**



● BDC-10 ○ HDT9 ● HDT49 ■ Supplemented ○ Control

**Figure 3: Postprandial plasma kinetics and Area under the curve during the metabolic tests**

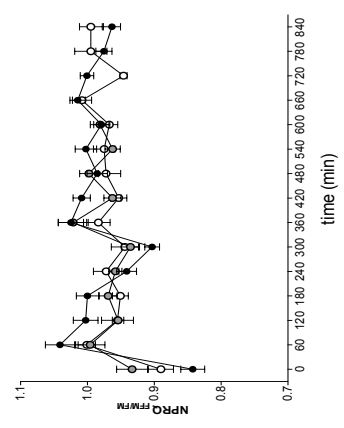
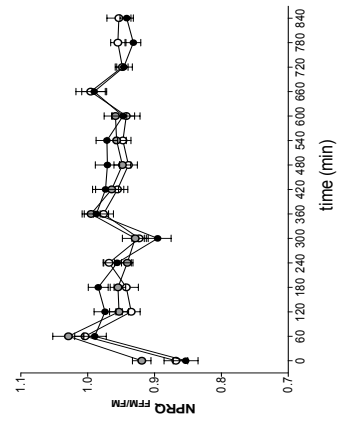
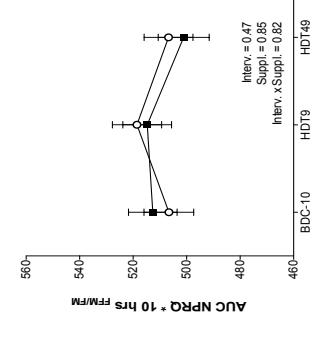
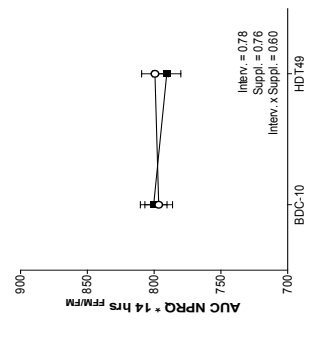
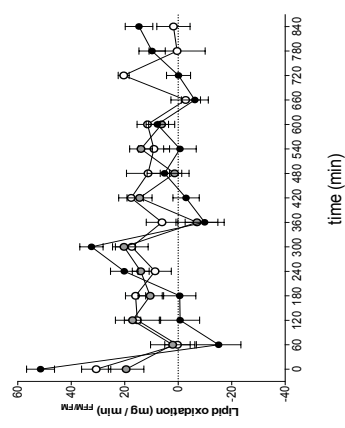
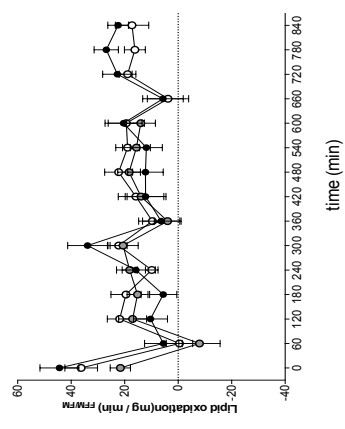
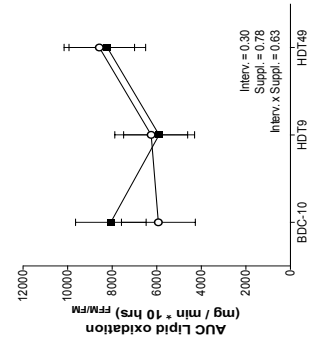
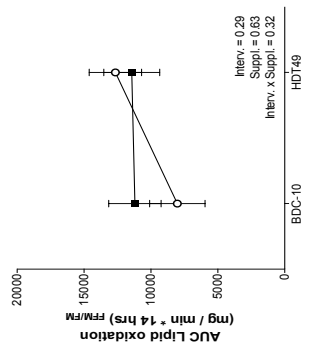
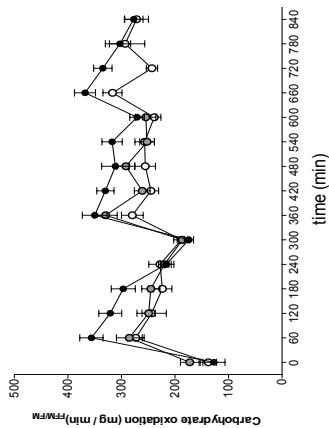
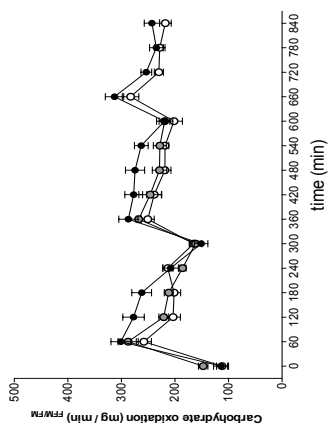
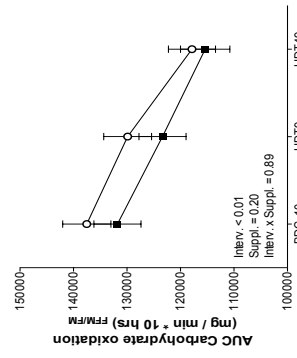
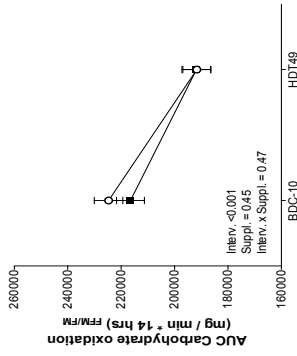
Area under the curve during both 10h and 14h calculated over each day of metabolic test for plasmatic glucose, insulin, NEFA, TG concentrations. Reported data have been adjusted for baseline. Results of the linear mixed model analysis are displayed on the figure with p-value for intervention (Interv.), cocktail supplementation (Suppl.) and the supplementation-by-intervention interaction (Interv. x Suppl.). Values are LSMeans  $\pm$  SEM.

**AUC: breakfast to pre-bedtime**

**AUC: breakfast to pre-dinner**

**kinetics Supplemented**

**kinetics Control**



■ Supplemented ○ Control

● HDT9 ○ HDT49

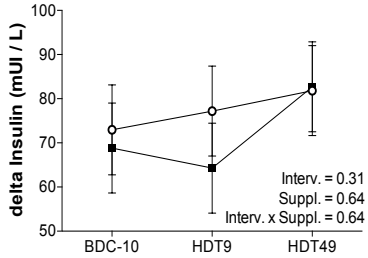
● BDC-10

**Figure 4: Postprandial substrate oxidation kinetics and area under the curve over time during the metabolic tests**

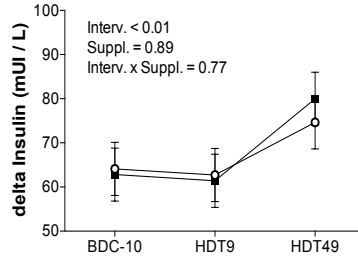
Area under the curve during both 10h and 14h calculated over each day of metabolic test for carbohydrate oxidation, lipid oxidation and NPRQ. Reported data have been adjusted for baseline. Oxidation data are adjusted on fat mass (FM) and fat-free mass (FFM). Results of the linear mixed model analysis are displayed on the figure with p-value for intervention (Interv.), cocktail supplementation (Suppl.) and the supplementation-by-intervention interaction (Interv. x Suppl.). Values are LSMeans  $\pm$  SEM.

**Metabolic flexibility indexes as  
delta (Max<sub>post meal</sub> - Fasting) following:**

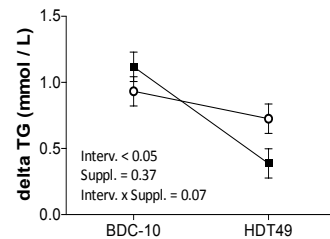
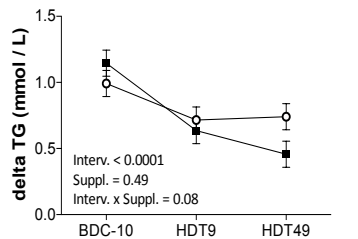
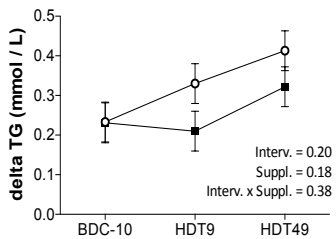
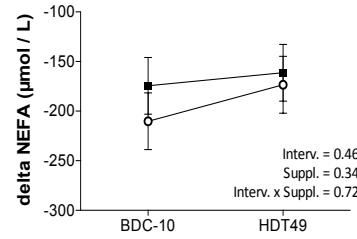
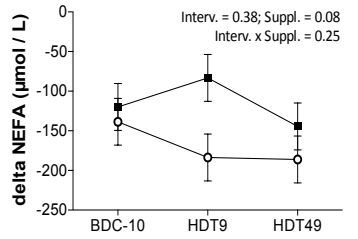
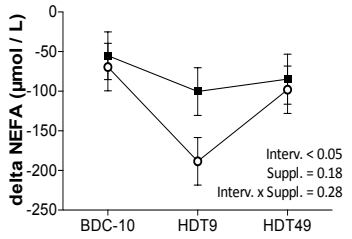
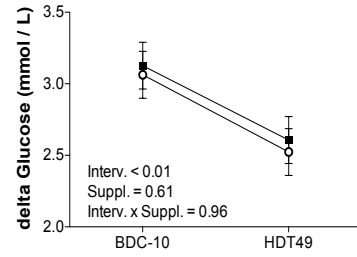
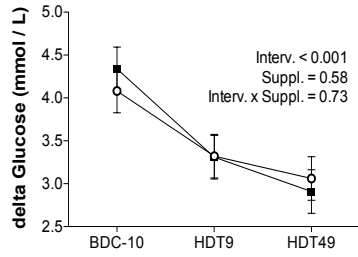
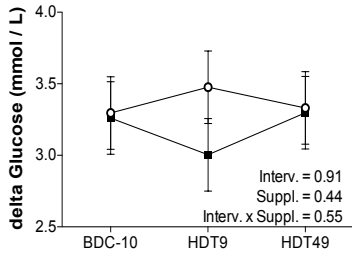
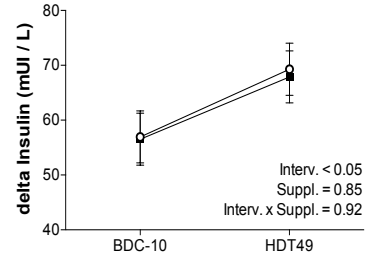
**Breakfast  
(eucaloric)**



**Lunch  
(50% CHO overfeeding)**



**Diner  
(50% CHO overfeeding)**



■ Supplemented  
○ Control

**Figure 5: Metabolic flexibility index for plasma measurements during each meal of metabolic test**

Specific metabolic flexibility index calculated as the subtraction of the fasting state values to the maximal values of both glucose and insulin obtained after breakfast, lunch and dinner during each day of lipid test. Reported data have been adjusted for baseline. Results of the linear mixed model analysis are displayed on the figure with p-value for intervention (Interv.), cocktail supplementation (Suppl.) and the supplementation-by-intervention interaction (Interv. x Suppl.). Values are LSMeans  $\pm$  SEM.

**Metabolic flexibility indexes as  
delta (Max<sub>post meal</sub> - Fasting) following:**

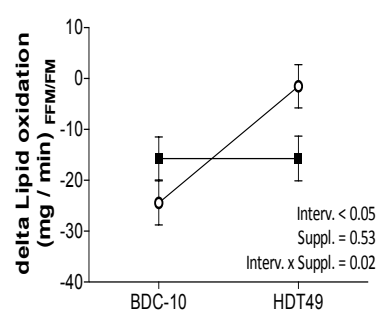
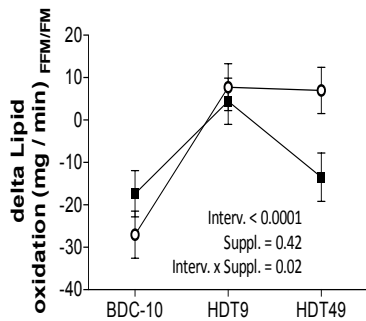
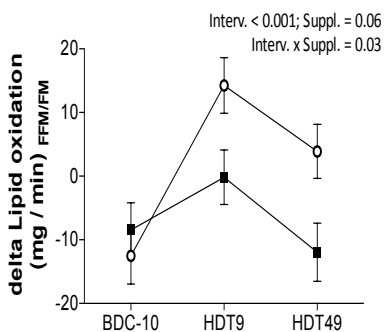
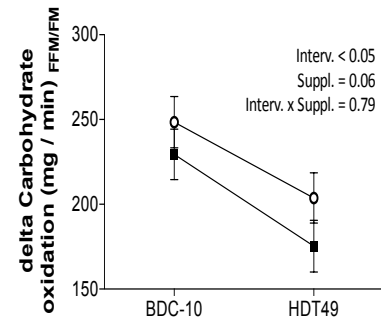
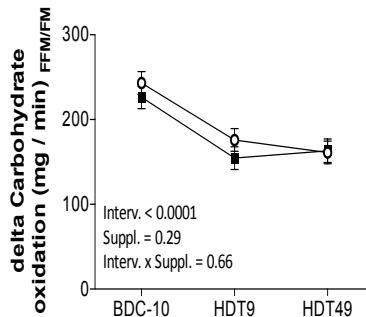
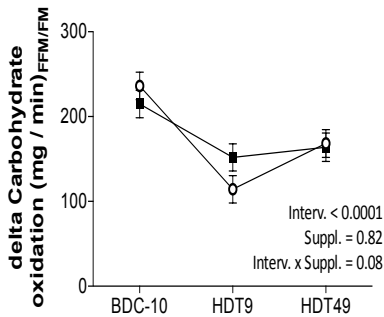
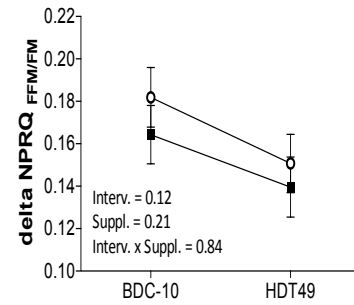
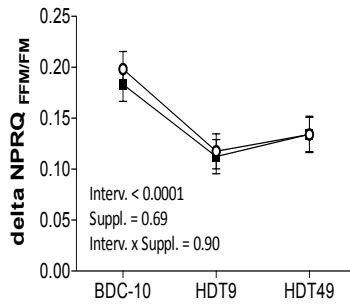
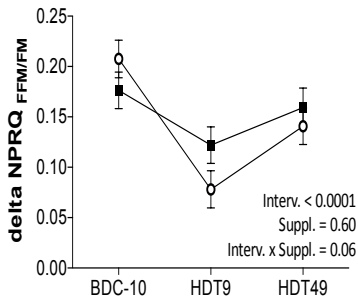
**Breakfast**  
*(eucaloric)*

**Lunch**

*(50% CHO overfeeding)*

**Diner**

*(50% CHO overfeeding)*



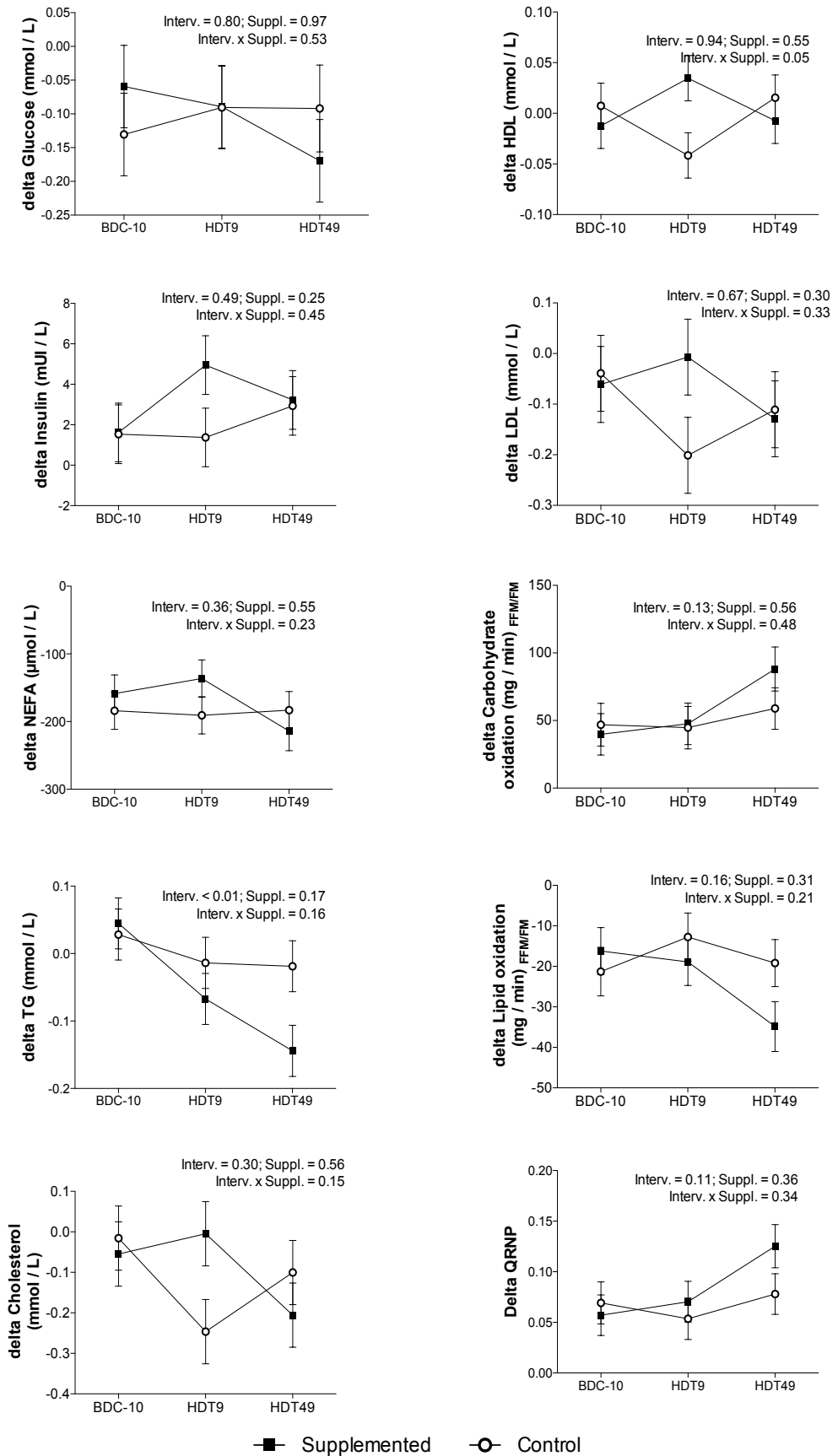
■ Supplemented  
○ Control



**Figure 6: Metabolic flexibility index for substrate oxidation during each meal of metabolic test**

Specific metabolic flexibility index calculated as the subtraction of the fasting state values to the maximal values of both carbohydrate oxidation, lipid oxidation and NPRQ obtained after breakfast, lunch and dinner during each day of lipid test. Reported data have been adjusted for baseline. Oxidation data are adjusted on fat mass (FM) and fat-free mass (FFM). Results of the linear mixed model analysis are displayed on the figure with p-value for intervention (Interv.), cocktail supplementation (Suppl.) and the supplementation-by-intervention interaction (Interv. x Suppl.). Values are LSMMeans  $\pm$  SEM.

**Changes in fasting metabolites and substrate oxidation following 24h CHO overfeeding:  
(delta fasting 24h - fasting 0h)**

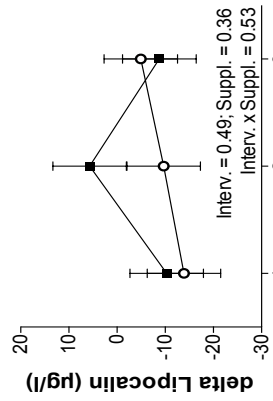
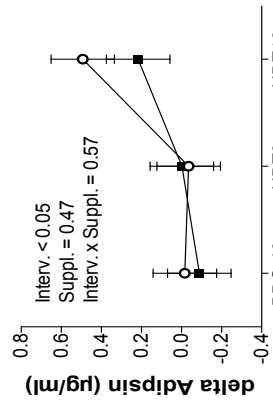
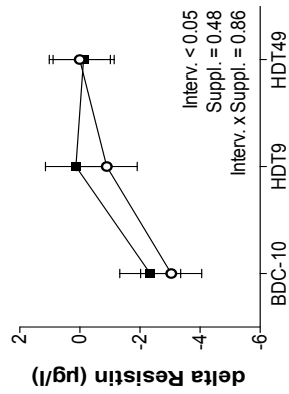
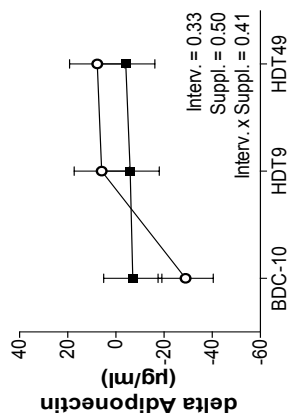


**Figure 7: Changes in fasting metabolites and substrate oxidation following 24-hour of carbohydrate overfeeding**

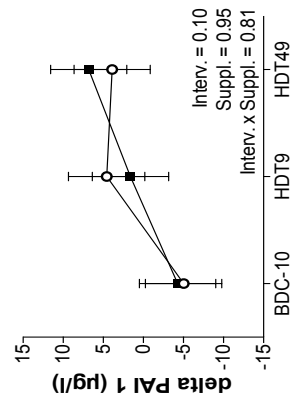
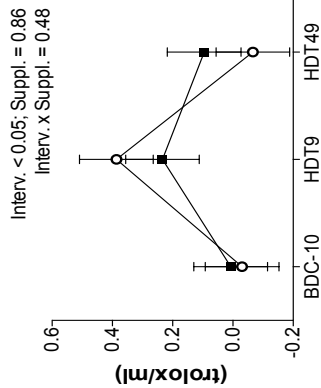
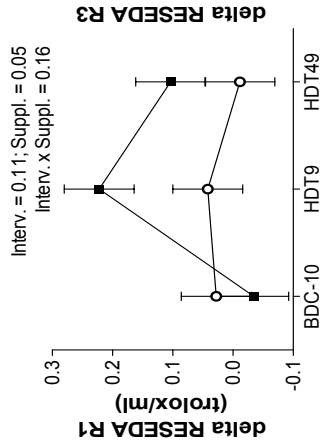
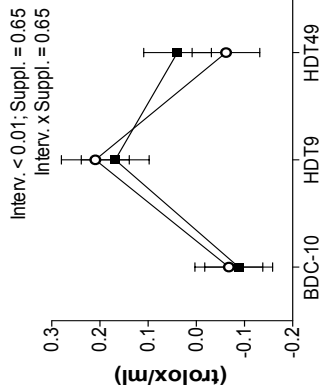
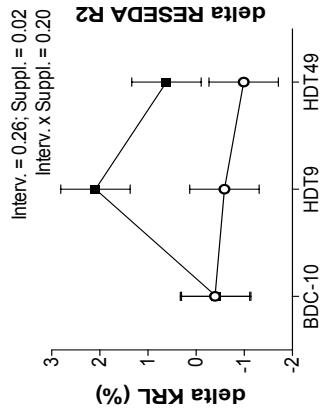
Changes in fasting glucose, insulin, NEFA, TG, cholesterol, HDL, LDL and fasting carbohydrate & lipid oxidation and NPRQ expressed as delta following 24-hour overfeeding. Reported data have been adjusted for baseline. Oxidation data are adjusted on fat mass (FM) and fat-free mass (FFM). Results of the linear mixed model analysis are displayed on the figure with p-value for intervention (Interv.), cocktail supplementation (Suppl.) and the supplementation-by-intervention interaction (Interv. x Suppl.). Values are LSMeans  $\pm$  SEM.

Changes in inflammation and oxidative stress markers following 24h CHO overfeeding:  
delta (fasting 24h - fasting 0h)

Inflammation



Oxidative stress



■ Supplemented  
○ Control

**Figure 8: Inflammation and free radicals defense after lipid test under carbohydrate overnutrition**

Inflammation and free radicals defense data are expressed as delta following 24-hour overfeeding. Delta D1 – D0 inflammation-related data are presented for adiponectin, resistin, adipon, lipocalin and PAI 1. Delta D1 – D0 oxidative stress-related data are presented for KRL (%) and RESEDA R1, R2, R3. Reported data have been adjusted for baseline. Results of the linear mixed model analysis are displayed on the figure with p-value for intervention (Interv.), cocktail supplementation (Suppl.) and the supplementation-by-intervention interaction (Interv. x Suppl.). Values are LSMeans ± SEM.

PAI 1: plasminogen activator inhibitor-1; KRL: Total antiradical defense potential (in French Kit Radicaux Libres); Reseda (in French REServes Défenses Antioxydantes) antiradical defense reserves unmasked by treatment of serum with 1: glucosides; 2: sulfates; 3: glucuronides.

| Variables           | BDC-14      |              | HDT4        |              | HDT58       |              | Mixed model <sup>1</sup> |                 |
|---------------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|--------------------------|-----------------|
|                     | Control     | Supplemented | Control     | Supplemented | Control     | Supplemented | Intervention             | Supplementation |
|                     | n=10        | n=10         | n=10        | n=10         | n=10        | n=10         | Interaction              | Interaction     |
| Age (years)         | 33.5 ± 2.7  | 34.8 ± 2.4   | 33.5 ± 2.7  | 34.8 ± 2.4   | 33.5 ± 2.7  | 34.8 ± 2.4   |                          |                 |
| Height (cm)         | 176.1 ± 1.6 | 176.1 ± 1.5  | 176.1 ± 1.6 | 176.1 ± 1.5  | 176.1 ± 1.6 | 176.1 ± 1.5  |                          |                 |
| Weight (kg)         | 73.0 ± 0.4  | 73.0 ± 0.4   | 72.2 ± 0.4  | 72.0 ± 0.4   | 70.9 ± 0.4  | 71.5 ± 0.4   | <0.0001                  | 0.78            |
| Fat mass (kg)       | 19.5 ± 0.2  | 19.5 ± 0.2   | 19.3 ± 0.2  | 19.4 ± 0.2   | 20.1 ± 0.2  | 20.8 ± 0.2   | <0.0001                  | 0.11            |
| Fat mass (%)        | 26.6 ± 0.2  | 26.6 ± 0.2   | 26.6 ± 0.2  | 26.8 ± 0.2   | 28.1 ± 0.2  | 29.0 ± 0.2   | <0.0001                  | 0.1             |
| Lean Body mass (kg) | 53.6 ± 0.3  | 53.4 ± 0.3   | 52.9 ± 0.3  | 52.6 ± 0.3   | 50.8 ± 0.3  | 50.6 ± 0.3   | <0.0001                  | 0.50            |

**Table 1: Anthropometry data**

Data are presented as LSMeans ± SEM. <sup>1</sup>Mixed models are adjusted on baseline.

| <b>Table 2. Nutrition</b> |                 |                     |                 |                     |
|---------------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| <b>Variables</b>          | <b>BDC</b>      |                     | <b>HDT</b>      |                     |
|                           | <b>Control</b>  | <b>Supplemented</b> | <b>Control</b>  | <b>Supplemented</b> |
|                           | n=10            | n=10                | n=10            | n=10                |
| Food intake (kcal)        | 2931.61 ± 77.26 | 2924.46 ± 51.65     | 2344.88 ± 61.81 | 2340.16 ± 41.45     |
| Carbohydrates (kcal)      | 1521.36 ± 40.45 | 1515.2 ± 28.21      | 1157.24 ± 30.48 | 1177 ± 19.27        |
| Lipids (kcal)             | 968.87 ± 26.22  | 976.59 ± 16.47      | 744.44 ± 18.93  | 730.36 ± 13.64      |
| Proteins (kcal)           | 359.45 ± 13.38  | 352.04 ± 9.05       | 359.36 ± 13.38  | 351.95 ± 9.14       |
| Carbohydrates (%)         | 51.91 ± 0.46    | 51.81 ± 0.33        | 49.37 ± 0.45    | 50.31 ± 0.29        |
| Lipids (%)                | 33.06 ± 0.32    | 33.40 ± 0.23        | 31.76 ± 0.17    | 31.21 ± 0.21        |
| Proteins (%)              | 12.24 ± 0.22    | 12.03 ± 0.14        | 15.30 ± 0.28    | 15.02 ± 0.17        |

**Table 2: Nutrition**

Means are ± SEM.

**Table 3. Magnetic resonance imaging data**

| Variables                        | BDC-13         |                |                |                | HDT47          |                |                |                | Mixed model <sup>1</sup> |                 |             |
|----------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------------------|-----------------|-------------|
|                                  | Control        |                | Supplemented   |                | Control        |                | Supplemented   |                | Intervention             | Supplementation | Interaction |
|                                  | n=10           | n=10           | n=10           | n=10           | n=10           | n=10           | n=10           | n=10           |                          |                 |             |
| Intra hepatic fat (%)            | 3.8 ± 0.3      | 3.9 ± 0.3      | 3.9 ± 0.3      | 3.9 ± 0.3      | 3.9 ± 0.3      | 4.0 ± 0.3      | 4.0 ± 0.3      | 4.0 ± 0.3      | 0.65                     | 0.68            | 0.93        |
| Intra muscular fat (%)           | 0.3 ± 0.1      | 0.3 ± 0.1      | 0.3 ± 0.1      | 0.3 ± 0.1      | 0.4 ± 0.1      | 0.3 ± 0.1      | 0.3 ± 0.1      | 0.3 ± 0.1      | 0.62                     | 0.62            | 0.55        |
| Intra abdominal fat (surface)    | 26886 ± 866.4  | 27062 ± 866.4  | 27062 ± 866.4  | 27062 ± 866.4  | 28558 ± 866.4  | 33015 ± 866.4  | 33015 ± 866.4  | 33015 ± 866.4  | <0.001                   | 0.02            | 0.03        |
| Belly subcutaneous fat (surface) | 15124 ± 266.76 | 15238 ± 266.76 | 15238 ± 266.76 | 15238 ± 266.76 | 15074 ± 266.76 | 15303 ± 266.76 | 15303 ± 266.76 | 15303 ± 266.76 | 0.98                     | 0.52            | 0.84        |
| Leg subcutaneous fat (surface)   | 14075 ± 474.72 | 14043 ± 474.72 | 14043 ± 474.72 | 14043 ± 474.72 | 15271 ± 474.72 | 16581 ± 474.72 | 16581 ± 474.72 | 16581 ± 474.72 | <0.01                    | 0.19            | 0.18        |
| Quadriceps atrophy (surface)     | 7833.1 ± 102.9 | 7786.1 ± 102.9 | 7786.1 ± 102.9 | 7786.1 ± 102.9 | 6856.4 ± 102.9 | 6680.1 ± 102.9 | 6680.1 ± 102.9 | 6680.1 ± 102.9 | <.0001                   | 0.25            | 0.57        |

**Table 3: Magnetic resonance imaging data**

Data are presented as LSMMeans ± SEM. <sup>1</sup>Mixed models are adjusted on baseline.



Table 4. Lipids data

| Variables  | BDC-10       |              |              | HDT9         |              |              | HDT49        |              |              | Mixed model <sup>1</sup> |                 |             |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------------------|-----------------|-------------|
|  | Control      | Supplemented | Control      | Control      | Supplemented | Control      | Supplemented | Control      | Supplemented | Intervention             | Supplementation | Interaction |
|  | n=10         | n=10         | n=10         | n=10         | n=10         | n=10         | n=10         | n=10         | n=10         |                          |                 |             |
| <b>Fasting values</b>  |              |              |              |              |              |              |              |              |              |                          |                 |             |
| cholesterol total (mmol/l)                                     | 4.17 ± 0.12  | 4.20 ± 0.12  | 4.14 ± 0.12  | 4.14 ± 0.12  | 3.92 ± 0.12  | 3.80 ± 0.12  | 3.87 ± 0.12  | 3.80 ± 0.12  | 3.87 ± 0.12  | <0.05                    | 0.76            | 0.24        |
| HDL (mmol/l)   | 1.27 ± 0.03  | 1.28 ± 0.03  | 1.18 ± 0.03  | 1.18 ± 0.03  | 1.06 ± 0.03  | 1.00 ± 0.03  | 0.97 ± 0.03  | 1.00 ± 0.03  | 0.97 ± 0.03  | <.0001                   | 0.17            | 0.03        |
| LDL (mmol/l)   | 2.57 ± 0.10  | 2.59 ± 0.10  | 2.55 ± 0.10  | 2.55 ± 0.10  | 2.52 ± 0.10  | 2.41 ± 0.10  | 2.56 ± 0.10  | 2.41 ± 0.10  | 2.56 ± 0.10  | 0.61                     | 0.64            | 0.55        |
| HDL max size (nm)  | 9.38 ± 0.14  | 9.37 ± 0.14  | 9.06 ± 0.14  | 9.06 ± 0.14  | 9.27 ± 0.14  | 9.11 ± 0.14  | 9.30 ± 0.14  | 9.11 ± 0.14  | 9.30 ± 0.14  | 0.13                     | 0.44            | 0.55        |
| LDL max size (nm)  | 26.25 ± 0.18 | 26.33 ± 0.18 | 25.76 ± 0.18 | 25.76 ± 0.18 | 25.42 ± 0.18 | 25.78 ± 0.18 | 25.39 ± 0.18 | 25.78 ± 0.18 | 25.39 ± 0.18 | <.0001                   | 0.33            | 0.19        |
| LDL/HDL (%)  | 10.77 ± 0.79 | 10.81 ± 0.79 | 12.17 ± 0.79 | 12.17 ± 0.79 | 12.06 ± 0.79 | 12.64 ± 0.79 | 13.82 ± 0.79 | 12.64 ± 0.79 | 13.82 ± 0.79 | <.001                    | 0.67            | 0.52        |
| HDL1 (%)   | 5.05 ± 0.24  | 5.00 ± 0.24  | 4.15 ± 0.14  | 4.15 ± 0.14  | 4.68 ± 0.14  | 3.43 ± 0.14  | 3.74 ± 0.14  | 3.43 ± 0.14  | 3.74 ± 0.14  | <.0001                   | 0.35            | 0.23        |
| HDL2b (%)  | 34.44 ± 0.86 | 34.55 ± 0.86 | 33.54 ± 0.86 | 33.54 ± 0.86 | 32.20 ± 0.86 | 30.75 ± 0.86 | 32.51 ± 0.86 | 30.75 ± 0.86 | 32.51 ± 0.86 | <.001                    | 0.85            | 0.06        |
| HDL2a (%)  | 24.95 ± 0.54 | 25.21 ± 0.54 | 26.04 ± 0.54 | 26.04 ± 0.54 | 24.11 ± 0.54 | 26.35 ± 0.54 | 24.61 ± 0.54 | 26.35 ± 0.54 | 24.61 ± 0.54 | 0.64                     | <.005           | 0.06        |
| HDL3a (%)  | 16.47 ± 0.48 | 16.56 ± 0.48 | 17.64 ± 0.48 | 17.64 ± 0.48 | 17.34 ± 0.48 | 18.31 ± 0.48 | 17.48 ± 0.48 | 18.31 ± 0.48 | 17.48 ± 0.48 | <.001                    | 0.53            | 0.54        |
| HDL3b (%)  | 9.40 ± 0.34  | 9.40 ± 0.34  | 9.87 ± 0.34  | 9.87 ± 0.34  | 10.81 ± 0.34 | 11.05 ± 0.34 | 11.08 ± 0.34 | 11.05 ± 0.34 | 11.08 ± 0.34 | <.0001                   | 0.3             | 0.23        |
| HDL3c (%)  | 9.60 ± 0.62  | 9.38 ± 0.62  | 8.60 ± 0.62  | 8.60 ± 0.62  | 10.98 ± 0.62 | 10.01 ± 0.62 | 10.71 ± 0.62 | 10.01 ± 0.62 | 10.71 ± 0.62 | 0.25                     | 0.16            | 0.05        |
| <b>Changes in fasting values following 24h CHO overfeeding</b> |              |              |              |              |              |              |              |              |              |                          |                 |             |
| Δ HDL size max   | -0.15 ± 0.14 | 0.02 ± 0.14  | 0.06 ± 0.14  | 0.06 ± 0.14  | 0.10 ± 0.14  | 0.05 ± 0.14  | -0.19 ± 0.14 | 0.05 ± 0.14  | -0.19 ± 0.14 | 0.53                     | 0.9             | 0.38        |
| Δ LDL size max   | -0.10 ± 0.14 | -0.28 ± 0.14 | -0.15 ± 0.14 | -0.15 ± 0.14 | -0.42 ± 0.14 | 0.08 ± 0.14  | 0.25 ± 0.14  | 0.08 ± 0.14  | 0.25 ± 0.14  | 0.08                     | 0.95            | 0.58        |
| Δ LDL/HDL  | 0.76 ± 0.58  | 0.18 ± 0.58  | 0.07 ± 0.58  | 0.07 ± 0.58  | 2.39 ± 0.58  | -0.78 ± 0.58 | 0.02 ± 0.58  | -0.78 ± 0.58 | 0.02 ± 0.58  | 0.06                     | 0.03            | 0.1         |
| Δ HDL1 (%)   | -0.60 ± 0.21 | -0.43 ± 0.21 | -0.45 ± 0.21 | -0.45 ± 0.21 | -0.57 ± 0.21 | 0.60 ± 0.21  | 0.82 ± 0.21  | 0.60 ± 0.21  | 0.82 ± 0.21  | <.0001                   | 0.56            | 0.69        |
| Δ HDL2b (%)  | 0.52 ± 0.57  | 0.53 ± 0.57  | 0.75 ± 0.57  | 0.75 ± 0.57  | 1.09 ± 0.57  | 0.42 ± 0.57  | 0.39 ± 0.57  | 0.42 ± 0.57  | 0.39 ± 0.57  | 0.59                     | 0.84            | 0.93        |
| Δ HDL2a (%)  | 2.02 ± 0.70  | 0.34 ± 0.70  | -0.36 ± 0.70 | -0.36 ± 0.70 | 0.72 ± 0.70  | -0.29 ± 0.70 | 0.00 ± 0.70  | -0.29 ± 0.70 | 0.00 ± 0.70  | 0.27                     | 0.68            | 0.25        |
| Δ HDL3a (%)  | 0.35 ± 0.42  | -0.14 ± 0.42 | -0.58 ± 0.42 | -0.58 ± 0.42 | -0.14 ± 0.42 | -0.47 ± 0.42 | -0.64 ± 0.42 | -0.47 ± 0.42 | -0.64 ± 0.42 | 0.35                     | 0.81            | 0.59        |
| Δ HDL3b (%)  | -0.57 ± 0.29 | -0.31 ± 0.29 | 0.28 ± 0.29  | 0.28 ± 0.29  | -0.23 ± 0.29 | -0.35 ± 0.29 | -0.69 ± 0.29 | -0.35 ± 0.29 | -0.69 ± 0.29 | 0.35                     | 0.22            | 0.33        |
| Δ HDL3c (%)  | -1.60 ± 0.65 | -0.11 ± 0.65 | 0.58 ± 0.65  | 0.58 ± 0.65  | -0.98 ± 0.65 | 0.23 ± 0.65  | -0.05 ± 0.65 | 0.23 ± 0.65  | -0.05 ± 0.65 | 0.46                     | 0.64            | 0.15        |

Table 4: Lipids data

Data are presented as LSMeans ± SEM. <sup>1</sup>Mixed models are adjusted on baseline.

HDL: High density lipoprotein; LDL: Low density lipoprotein; TG: Triglycerides; NEFA: Non-esterified fatty acids.

Table 5. Inflammation and oxidative stress

| Variables                              | BDC-10       |              | HDT9         |              | HDT49        |              | Mixed model <sup>1</sup> |                 |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------------------|-----------------|
|  | Control      | Supplemented | Control      | Supplemented | Control      | Supplemented | Intervention             | Supplementation |
|  | n=10         | n=10         | n=10         | n=10         | n=10         | n=10         |                          |                 |
| KRL (%)                                | 27.04 ± 0.79 | 26.98 ± 0.79 | 29.11 ± 0.79 | 29.62 ± 0.79 | 28.24 ± 0.79 | 30.28 ± 0.79 | <0.01                    | 0.21            |
| KRL (mmol Trolox/L)                    | 3.05 ± 0.10  | 3.03 ± 0.10  | 3.28 ± 0.10  | 3.30 ± 0.10  | 3.18 ± 0.10  | 3.41 ± 0.10  | 0.02                     | 0.35            |
| Reseda 1 (Glucosides, mmol Trolox/L)   | 0.91 ± 0.06  | 0.93 ± 0.06  | 0.85 ± 0.06  | 0.97 ± 0.06  | 0.99 ± 0.06  | 0.99 ± 0.06  | 0.33                     | 0.43            |
| Reseda 2 (Sulphates, mmol Trolox/L)    | 1.42 ± 0.08  | 1.46 ± 0.08  | 1.20 ± 0.08  | 1.33 ± 0.08  | 1.57 ± 0.08  | 1.44 ± 0.08  | <0.01                    | 0.87            |
| Reseda 3 (Glucuronides, mmol Trolox/L) | 2.16 ± 0.11  | 2.28 ± 0.11  | 2.03 ± 0.11  | 2.24 ± 0.11  | 2.46 ± 0.11  | 2.29 ± 0.11  | 0.11                     | 0.51            |
| Adiponectin (µg/mL)                    | 19.66 ± 2.28 | 22.97 ± 2.28 | 13.44 ± 2.28 | 12.95 ± 2.28 | 15.92 ± 2.28 | 10.33 ± 2.28 | <0.001                   | 0.69            |
| Resistin (µg/L)                        | 17.82 ± 1.24 | 17.91 ± 1.24 | 17.91 ± 1.24 | 16.54 ± 1.24 | 16.33 ± 1.24 | 16.76 ± 1.24 | 0.54                     | 0.82            |
| Lipocalin (µg/mL)                      | 93.50 ± 7.90 | 93.53 ± 7.90 | 96.27 ± 7.90 | 78.94 ± 7.90 | 88.02 ± 7.90 | 93.81 ± 7.90 | 0.79                     | 0.52            |
| Adipsin (µg/mL)                        | 2.95 ± 0.14  | 2.99 ± 0.14  | 2.69 ± 0.14  | 2.60 ± 0.14  | 2.51 ± 0.14  | 2.50 ± 0.14  | <0.01                    | 0.89            |
| PAI1 (µg/mL)                           | 50.16 ± 3.64 | 51.50 ± 3.64 | 40.76 ± 3.64 | 46.10 ± 3.64 | 43.60 ± 3.64 | 50.98 ± 3.64 | 0.11                     | 0.16            |

Table 5: Inflammation and oxidative stress data

Data are presented as LSMeans ± SEM. <sup>1</sup>Mixed models are adjusted on baseline.

KRL: Total antiradical defense potential (in French Kit Radicaux Libres); Reseda (in French RESErves Défenses Antioxydantes) R1, R2 and R3: antiradical defense reserves unmasked by treatment of serum with respectively glucosides, sulphates or glucuronides.

# DISCUSSION

The main goals of this thesis were 1) to characterize the negative impact of microgravity-induced physical inactivity on lipid metabolism, inflammation, insulin sensitivity and more specifically to the development of metabolic inflexibility and ectopic fat storage and 2) to demonstrate the impact of a nutritional antioxidant and anti-inflammatory cocktail countermeasure to prevent/reduce metabolic deconditioning from a 60-day bed rest study. To do so, a pilot-study was conducted to test the impact of the cocktail supplementation during a 20-day sedentarization protocol coupled with high fructose-glucose ingestion in order to trigger metabolic adaptations. Based on the promising results obtained from this study, the antioxidant and anti-inflammatory cocktail supplementation was used as a countermeasure during a 60-day bed-rest.

The pilot study led by our team showed that enforced physical inactivity and fructose overfeeding induced no change in glucose concentration but induced an increase in insulin concentration and a decrease in insulin sensitivity. Furthermore, physical inactivity coupled with fructose-glucose overfeeding resulted in gradual increase in TG and VLDL-TG that was explained by a drop in lipid oxidation and increased *de novo* lipogenesis. Finally, physical inactivity induced decreased cross-sectional area of type II myosin Heavy Chain that can be explained by increased proteolysis. According to previously described metabolic flexibility index [115], enforced physical inactivity also led to the development of metabolic inflexibility. Metabolic inflexibility appeared to be an acute adaptation to bed-rest as it was observed after only nine days of bed rest, that was maintained over time. It was associated with a decrease in insulin sensitivity, fasting and postprandial hypertriglyceridemia, ectopic fat storage and concomitant to muscular atrophy. Inflammation processes were also affected by bed-rest-induced physical inactivity. Altogether, these data emphasize the preponderant role of physical inactivity in triggering metabolic inflexibility and thus confirm our hypothesis and previous data. Contrary to our hypothesis, we however were not able to show a relationship between metabolic inflexibility, *de novo* lipogenesis and ectopic fat storage during bed rest.

The second objective was to assess the impact of an antioxidant and anti-inflammatory cocktail supplementation to counteract metabolic adaptations induced by physical inactivity and simulated weightlessness. From the pilot study, we failed to demonstrate a positive influence of the dietary cocktail on both glucose, insulin concentrations and insulin sensitivity. On the contrary we did see that supplementation helped to maintain metabolic flexibility. These results have to be associated with the maintenance of lipid oxidation, mitigation of hypertriglyceridemia as well as VLDL-enriched triglycerides and an attenuation of *de novo* lipogenesis. Also, we have demonstrated that cocktail supplementation counteracted the decrease in type II Myosin heavy Chain cross sectional areas that can be explained by the inhibition of proteolytic responses. While promising, these results were not fully confirmed during the 60-day bed-rest study. Indeed, supplementation did not counteract the drop in lipid oxidation nor the ectopic intra-abdominal and leg subcutaneous fat storage. Moreover, the supplementation did counteract the metabolic inflexibility state, only partially, as the positive effects of the cocktail were no longer observable following the consumption of hypercaloric high carbohydrate meals. In comparison to the pilot study results, the cocktail supplementation did not delay muscle disuse atrophy either. Nonetheless, the supplementation counteracted the

rise in triglyceridemia observed in both fasting and postprandial state following standard or carbohydrate overnutrition. Moreover, supplementation protected against the rise in triglyceridemia from both acute and chronic bed-rest adaptations. It should be noted that exercise countermeasure (resistive alone or resistive and aerobic physical activities) did not prevent hypertriglyceridemia, substrate shift, and lipid oxidation in both fasting and postprandial state even when large volumes of exercise were prescribed (WISE2005). Nonetheless exercise countermeasures did show a positive impact on insulin resistance [139, 140].

While used as an antioxidant and anti-inflammatory countermeasure, the cocktail supplementation could prevent at least partially from acute inflammation and oxidative stress caused by bed rest but failed to counteract the chronic bed-rest inflammatory and oxidative stress adaptations. Altogether these data highlight that physical inactivity is the main trigger of several metabolic adaptations that lead to the development of insulin resistance, ectopic fat storage, hypertriglyceridemia, all promoting the development of a metabolic inflexibility state. Acute physical inactivity-induced adaptations appeared as soon as after nine days of bed-rest and are maintained as long as physical inactivity period lasts. Of note, some of the physical inactivity-induced adaptations are worsened, leading to chronic metabolic adaptations. Furthermore, we showed that cocktail supplementation should prevent or reduce short-term adaptations following 20 days of physical inactivity and acute and chronic bed-rest-induced metabolic adaptations. Main results obtained during this thesis are summarized in Table 1. The effect of the cocktail has been also indicated.

| Outcomes  | Pilot study               |  | Bed rest study     |                     |
|---|---------------------------|--|--------------------|---------------------|
|   | 10 days of step reduction | 10 days of step reduction + fructose overfeeding | 9 days of bed rest | 49 days of bed rest |
|   | Control                   | Cocktail   | Control            | Cocktail            |
| Fat Mass  | ↑                         | —  | ↑                  | ↑                   |
| Muscle mass   | —                         | —  | ↓                  | ↓                   |
| Muscle fiber Type I   | —                         | —  | —                  | —                   |
| Muscle fiber Type IIa   | ↓                         | +++  | —                  | —                   |
| Intra-hepatic fat   | —                         | —  | —                  | —                   |
| Intra-muscular fat  | —                         | —  | —                  | —                   |
| Intra-abdominal fat   | —                         | —  | —                  | —                   |
| Subcutaneous leg fat  | —                         | —  | —                  | —                   |
| Belly subcutaneous fat  | —                         | —  | —                  | —                   |
| Fasting conditions  |                           |  |                    |                     |
| Insulin sensitivity   | —                         | —  | —                  | —                   |
| Glucose concentration   | —                         | —  | ↓                  | ↓                   |
| Triglyceridemia   | ↑                         | +++  | ↑                  | +++                 |
| Carbohydrate oxidation  | —                         | —  | —                  | —                   |
| Lipid oxidation   | —                         | —  | ↓                  | ↓                   |
| Oxidative stress  | —                         | —  | ↑                  | ↑                   |
| Anti-oxidant capacities   | —                         | —  | ↓                  | ↓                   |
| Inflammation  | —                         | —  | ↑                  | ↑↑                  |
| Postprandial conditions   |                           |  |                    |                     |
| Insulin sensitivity   | ↓                         | —  | —                  | —                   |
| Glucose tolerance   | —                         | —  | —                  | —                   |
| Triglyceridemia   | ↑                         | +  | ↑                  | ↑                   |
| Carbohydrate oxidation  | ↑                         | —  | —                  | —                   |
| Lipid oxidation   | ↓                         | +  | ↓                  | ↓                   |
| De novo lipogenesis   | ↑                         | +  | ↑                  | ↑                   |
| Oxidative stress  | —                         | —  | —                  | —                   |
| Anti-oxidant capacities   | —                         | —  | —                  | —                   |
| Inflammation  | —                         | —  | —                  | —                   |
| Metabolic flexibility   | ↓                         | +++  | ↓                  | +++                 |
| Postprandial conditions in response to hypercaloric high carbohydrate meals |                           |  |                    |                     |
| Insulin sensitivity   | —                         | —  | ↓                  | ↓                   |
| Glucose tolerance   | —                         | —  | —                  | —                   |
| Triglyceridemia   | —                         | —  | ↓                  | —                   |
| Carbohydrate oxidation  | —                         | —  | ↓                  | —                   |
| Lipid oxidation   | —                         | —  | ↓                  | —                   |
| De novo lipogenesis   | —                         | —  | ↓                  | —                   |
| Metabolic flexibility   | —                         | —  | ↓                  | —                   |
| Oxidative stress  | —                         | —  | ↑                  | —                   |
| Anti-oxidant capacities   | —                         | —  | ↓                  | —                   |
| Inflammation  | —                         | —  | ↑                  | —                   |

**Table 1: Summary of thesis results**

Changes observed in the control group are all reported, direction of the changes been illustrated by the direction of the arrows.

The preventive effect of the cocktail is illustrated by ‘+’. The amplitude of the effect is represented by the number of ‘+’ symbols. The ‘-’ symbol means the cocktail had no effect and the changes observed in the control group were similarly observed in the supplemented group.

Of note, our studies have some limitations that need to be pointed out. First of all, each study had two distinct groups but the control group did not take a placebo supplementation due to difficulties to find a neutral oil to encapsulate. Moreover, we first tested the efficacy of an anti-inflammatory and antioxidant cocktail supplementation during 20 days of enforced physical inactivity. Hereafter, the cocktail supplementation was used as a countermeasure during 60 days of anti-orthostatic bed rest. While the step reduction paradigm levels close to those found in sedentary population, bed-rest studies induce extreme levels of physical inactivity that lead to more severe physiological adaptations than a study of enforced physical activity reduction and sedentarization. This could explain the discrepancies between the two studies conducted. Nonetheless, we took this consideration into account. In addition, the cocktail composition and dose were slightly different during the bed-rest compared to the pilot study. Indeed, the total dose of polyphenols were increased by 211,5mg/d in comparison to the pilot study, with also some adjustments in different polyphenols fractions such like quercetin. Otherwise, selenium, vitamin E and omega-3 doses were not changed between the two studies. Another point to discuss concerns the population of individuals who composed the two studies carried out. Indeed, the pilot study was conducted on twenty healthy and exercised men that were used to walk more than 14,000 – 15,000 steps per day and engaged in sports. On the other hand, bed-rest study was conducted in healthy males but not as active as were the subjects from the pilot study. Thus, cessation of physical activity could trigger greater metabolic adaptations for healthy and physically active men than for healthy male that were less active. This may partly explain the greater impact we noticed from pilot study on metabolism than what we observed with bed-rest, while bed rest induces more severe levels of physical inactivity. Nonetheless, it has to be highlighted that we took care to maximize the delta in physical activity during the bed-rest study. Indeed, during the baseline control period, subject's steps were controlled on a daily basis. Volunteers were engaged in bicycle and running sport session. Moreover, during the first day of bed-rest, subjects were bedridden from 9 am to allow them to walk early in the morning. The goal was to prevent any deconditioning during the ambulatory controlled period when subjects were confined in the clinic. It further potentiated the difference between the ambulatory control period and the bed-rest. Also, our results are based on healthy populations and could not be generalized to the entire population and so data interpretation can only be limited to young active men. Future studies will be needed in women. Although these data cannot be generalized to the general population, the results are interpretable and benefit astronauts through a better understanding of microgravity-related adaptations.





# PERSPECTIVES

The 60-day bed-rest study was conducted over two sessions that respectively occurred from January to April 2017 and from September to December of the same year. While the results presented above allowed us to draw solid conclusions on the metabolic adaptations of 60 days of simulated weightlessness, complementary analyzes would also permit us to better understand our results. Firstly, several stable isotopes were infused during the metabolic tests. Indeed, 6,6<sup>2</sup>H<sub>2</sub> Glucose (0,355μmol/kg/min) and D5-Glycerol (0,1μmol/kg/min) bolus and infusions were used to measure intermediary metabolism and fluxes. Also, uniformly labelled U-<sup>13</sup>C glucose (1% of ingested glucose) was added to the three meals consumed during the metabolic tests. Then, several analyzes will be added from the use of these stable isotopes. Our goal was to measure both liver and gut *de novo* lipogenesis as well as neoglucogenesis. These analyzes depend on the measurements of both chylomicrons- and VLDL-enriched triglycerides. However, stable isotopes were only used during the control period and at the end of bed-rest, not after 9 days of bed rest. Thus, our results will give us information on chronic bed-rest adaptations to gut and liver *de novo* lipogenesis, which will be highly informative. Stable isotopes analysis will also allow us to assess exogenous carbohydrate oxidation, endogenous glucose production rate as well as non-oxidative disposal and whole-body lipolysis rates. In order to do that, we need also to quantitate the entire glucose ingested from the different meals. All of these analyzes are in progress in the laboratory. These data will provide with further insights in the mechanisms underlying the development of hypertriglyceridemia. We will be also examining the relationships between changes in *de novo* lipogenesis, gluconeogenesis and lipolysis and changes in intra-abdominal fat and subcutaneous leg fat storage. Moreover, actiwaves were used during the metabolic tests to measure heart rate. Changes in heart rate will be used as an index of the evolution of sympathetic and parasympathetic nervous system during bed rest. We will further assess both acute and chronic nervous system adaptations induced by bed-rest. Of note, we were also interested in assessing the evolution of satiety hormones over the time course of bed-rest. To do so, subjects completed satiety tests before and after each meal during the metabolic tests. In addition, different satiety hormones will be dosed. Also, both muscular and adipose tissue have been collected. Concomitant with muscular atrophy we already observed based on MRI data, several analyzes conducted in relation with our team could add new insights on acute and chronic muscular adaptations induced by bed-rest. As shown by western-blot analyzes from the pilot-study muscular biopsies, western-blot analyzes will permit to highlight pathways that could lead to muscular atrophy. Moreover, muscular biopsies will allow us to assess the evolution of mitochondrial capacity induced by simulated weightlessness. Moreover, intramyocellular lipid storage have been linked to metabolic disorders. Particularly, lipid intermediates like diacylglycerol and ceramides could induce lipid-induced insulin resistance [104]. Given this, the study of intramyocellular triglycerides as well as both diacylglycerol and ceramide deposition in muscle biopsies could be of real interest to better understand the mechanisms underlying metabolic disorders induced by bed-rest.

Various studies carried out in *in vitro* or on animal models have shown that nutritional supplementation with polyphenols (resveratrol) can mimic the beneficial effects normally generated by physical activity. However, studies showing a positive effect of resveratrol

supplementation are few and some publications even show that ingestion of resveratrol, along with other antioxidants, obscures the positive effects of physical activity. As a result, regular physical activity appears to be the best way to maintain one's physical condition and health [325]. Nonetheless, the importance of appropriate food intake should not be neglected in order to potentiate the possible beneficial effects on insulin sensibility, glucose tolerance, inflammation, oxidative stress as well as metabolic flexibility. Of note, previous studies already showed that both resistive and endurance physical activity have beneficial effects on insulin resistance and carbohydrate metabolism [139, 140]. Nonetheless, exercise training requires effort and is time consuming. Furthermore, future exploration-class missions will maybe not have the volume or vehicle power to support large or multiple exercise devices such as those on the ISS. Based on these limitations, Ploutz-Snyder et al. investigated the effectiveness of a new integrated aerobic and resistance exercise training prescription (SPRINT) during a 70-day bed-rest study. Interestingly, the SPRINT protocol mitigated bed-rest-induced muscle and cardiac deconditioning induced by bed-rest. Of note, this new exercise protocol requires less time than historic ISS exercise training programs. Then a new exercise approach appears to be effective in maintaining multi-system function with a suite of exercise equipment designed to mimic exercises that can be performed on the ISS and could be of major interest for the design and implementation of exercised-based countermeasures on future long duration missions [326]. Nonetheless, the study of Ploutz-Snyder et al. focused on performance, muscle mass, cardiac morphology and function and bone health, new studies investigating such an integrated countermeasure on metabolic adaptation could bring new insights on the usefulness of this new exercise-based countermeasure for future missions.

Also, new studies are needed to better understand the impact of prolonged bed rest on described physiological functions in order to highlight the mechanisms underlying functional adaptations induced by real and simulated microgravity. Moreover, new protocols involving the use of nutritional countermeasures, need to be deepened to better understand the mechanisms to counteract bed-rest adaptations.

Finally, physical inactivity appears to be the main trigger point of metabolic bed-rest adaptations in the study we conducted. Thus, future studies should consider the combination of both exercise and cocktail supplementation in order to trigger synergistic effects from both supplementation in prolonged bed-rest studies.

# References

1. Smith, S.M., et al., *Fifty years of human space travel: implications for bone and calcium research*. Annu Rev Nutr, 2014. **34**: p. 377-400.
2. Campbell, M.R. and J.B. Charles, *Historical review of lower body negative pressure research in space medicine*. Aerospace medicine and human performance, 2015. **86**(7): p. 633-640.
3. Gemignani, J., T. Gheysens, and L. Summerer, *Beyond astronaut's capabilities: the current state of the art*. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc., 2015.
4. Boice, J.D., Jr., *Space: The Final Frontier-Research Relevant to Mars*. Health Phys, 2017. **112**(4): p. 392-397.
5. Payne, M.W., D.R. Williams, and G. Trudel, *Space flight rehabilitation*. Am J Phys Med Rehabil, 2007. **86**(7): p. 583-91.
6. Vernikos, J. and V.S. Schneider, *Space, gravity and the physiology of aging: parallel or convergent disciplines? A mini-review*. Gerontology, 2010. **56**(2): p. 157-66.
7. Williams, D., et al., *Acclimation during space flight: effects on human physiology*. CMAJ, 2009. **180**(13): p. 1317-23.
8. Adams, G.R., V.J. Caiozzo, and K.M. Baldwin, *Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models*. J Appl Physiol (1985), 2003. **95**(6): p. 2185-201.
9. Hargens, A.R. and L. Vico, *Long-duration bed rest as an analog to microgravity*. J Appl Physiol (1985), 2016. **120**(8): p. 891-903.
10. Tanaka, K., N. Nishimura, and Y. Kawai, *Adaptation to microgravity, deconditioning, and countermeasures*. J Physiol Sci, 2017. **67**(2): p. 271-281.
11. Hargens, A.R., R. Bhattacharya, and S.M. Schneider, *Space physiology VI: exercise, artificial gravity, and countermeasure development for prolonged space flight*. Eur J Appl Physiol, 2013. **113**(9): p. 2183-92.
12. Pavy-Le Traon, A., et al., *From space to Earth: advances in human physiology from 20 years of bed rest studies (1986-2006)*. Eur J Appl Physiol, 2007. **101**(2): p. 143-94.
13. Watenpaugh, D.E., *Analogs of microgravity: head-down tilt and water immersion*. J Appl Physiol (1985), 2016. **120**(8): p. 904-14.
14. [<energy expenditure and balance during spacflights.pdf>](#).
15. Arborelius, M., Jr., et al., *Hemodynamic changes in man during immersion with the head above water*. Aerosp Med, 1972. **43**(6): p. 592-8.
16. Epstein, M., *Renal, endocrine and hemodynamic effects of water immersion in man*. Contrib Nephrol, 1984. **41**: p. 174-88.
17. Epstein, M., P. Norsk, and R. Loutzenhiser, *Effects of water immersion on atrial natriuretic peptide release in humans*. Am J Nephrol, 1989. **9**(1): p. 1-24.
18. Navasiolava, N.M., et al., *Long-term dry immersion: review and prospects*. Eur J Appl Physiol, 2011. **111**(7): p. 1235-60.
19. Dietrick, J., et al., *Effect of immobilization on metabolic and physiologic functions of normal men*. Am J Med 1948.
20. Ploutz-Snyder, L., *Evaluating countermeasures in spaceflight analogs*. J Appl Physiol (1985), 2016. **120**(8): p. 915-21.
21. Morey-Holton, E.R. and R.K. Globus, *Hindlimb unloading rodent model: technical aspects*. J Appl Physiol (1985), 2002. **92**(4): p. 1367-77.
22. Globus, R.K. and E. Morey-Holton, *Hindlimb unloading: rodent analog for microgravity*. J Appl Physiol (1985), 2016. **120**(10): p. 1196-206.

23. Demontis, G.C., et al., *Human Pathophysiological Adaptations to the Space Environment*. Front Physiol, 2017. **8**: p. 547.
24. Vernikos, J., et al., *THESEUS: The European research priorities for human exploration of space*. NPJ Microgravity, 2016. **2**: p. 16034.
25. Maalouf, M., M. Durante, and N. Foray, *Biological Effects of Space Radiation on Human Cells: History, Advances and Outcomes*. Journal of Radiation Research, 2011. **52**(2): p. 126-146.
26. Sihver, L., et al., *Radiation environment at aviation altitudes and in space*. Radiat Prot Dosimetry, 2015. **164**(4): p. 477-83.
27. Cucinotta, F.A., *Review of NASA approach to space radiation risk assessments for Mars exploration*. Health Phys, 2015. **108**(2): p. 131-42.
28. Baker, J.E., J.E. Moulder, and J.W. Hopewell, *Radiation as a risk factor for cardiovascular disease*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(7): p. 1945-56.
29. Durante, M., *Physical and biomedical countermeasures for space radiation risk*. Z Med Phys, 2008. **18**(4): p. 244-52.
30. Cucinotta, F.A. and M. Durante, *Cancer risk from exposure to galactic cosmic rays: implications for space exploration by human beings*. Lancet Oncol, 2006. **7**(5): p. 431-5.
31. Guo, J.H., et al., *Keeping the right time in space: importance of circadian clock and sleep for physiology and performance of astronauts*. Military medical research, 2014.
32. Liu, Q., et al., *Acclimation during space flight: effects on human emotion*. Mil Med Res, 2016. **3**: p. 15.
33. Grabherr, L. and F.W. Mast, *Effects of microgravity on cognition: The case of mental imagery*. J Vestib Res, 2010. **20**(1): p. 53-60.
34. Yi, B., et al., *Reductions in circulating endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol levels in healthy human subjects exposed to chronic stressors*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2016. **67**: p. 92-7.
35. Vigo, D.E., et al., *Circadian rhythm of autonomic cardiovascular control during Mars500 simulated mission to Mars*. Aviat Space Environ Med, 2013. **84**(10): p. 1023-8.
36. Palinkas, L.A., et al., *Incidence of psychiatric disorders after extended residence in Antarctica*. Int J Circumpolar Health, 2004. **63**(2): p. 157-68.
37. Pagel, J.I. and A. Chouker, *Effects of isolation and confinement on humans-implications for manned space explorations*. J Appl Physiol (1985), 2016. **120**(12): p. 1449-57.
38. Palinkas, L.A., et al., *A randomized placebo-controlled clinical trial of the effectiveness of thyroxine and triiodothyronine and short-term exposure to bright light in prevention of decrements in cognitive performance and mood during prolonged Antarctic residence*. Clin Endocrinol (Oxf), 2010. **72**(4): p. 543-50.
39. Zwart, S.R., et al., *Response to vitamin D supplementation during Antarctic winter is related to BMI, and supplementation can mitigate Epstein-Barr Virus Reactivation*. J Nutr, 2011. **141**(4): p. 692-7.
40. Abeln, V., et al., *Exercise in isolation--a countermeasure for electrocortical, mental and cognitive impairments*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0126356.
41. Schneider, S., et al., *Exercise as a countermeasure to psycho-physiological deconditioning during long-term confinement*. Behav Brain Res, 2010. **211**(2): p. 208-14.
42. Crucian, B., et al., *Terrestrial stress analogs for spaceflight associated immune system dysregulation*. Brain Behav Immun, 2014. **39**: p. 23-32.

43. Pietsch, J., et al., *The effects of weightlessness on human organism and mammalian cells*. Current molecular medicine, 2011.
44. Blaber, E., H. Marcal, and B.P. Burns, *Bioastronautics: the influence of microgravity on astronaut health*. Astrobiology, 2010. **10**(5): p. 463-73.
45. Frippiat, J.P., et al., *Towards human exploration of space: The THESEUS review series on immunology research priorities*. NPJ Microgravity, 2016. **2**: p. 16040.
46. Yi, B., et al., *520-d Isolation and confinement simulating a flight to Mars reveals heightened immune responses and alterations of leukocyte phenotype*. Brain Behav Immun, 2014. **40**: p. 203-10.
47. Shearer, W.T., et al., *Suppression of human anti-inflammatory plasma cytokines IL-10 and IL-1RA with elevation of proinflammatory cytokine IFN-gamma during the isolation of the Antarctic winter*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **109**(5): p. 854-7.
48. Hargens, A.R. and D.E. Watenpaugh, *Cardiovascular adaptation to spaceflight*. Med Sci Sports Exerc, 1996. **28**(8): p. 977-82.
49. Aubert, A.E., et al., *Towards human exploration of space: the THESEUS review series on cardiovascular, respiratory, and renal research priorities*. NPJ Microgravity, 2016. **2**: p. 16031.
50. Hargens, A.R. and S. Richardson, *Cardiovascular adaptations, fluid shifts, and countermeasures related to space flight*. Respir Physiol Neurobiol, 2009. **169 Suppl 1**: p. S30-3.
51. Leach, C.S., et al., *Regulation of body fluid compartments during short-term spaceflight*. J Appl Physiol (1985), 1996. **81**(1): p. 105-16.
52. Hodkinson, P.D., et al., *An overview of space medicine*. Br J Anaesth, 2017. **119**(suppl\_1): p. i143-i153.
53. Iskovitz, I., M. Kassemi, and J.D. Thomas, *Impact of weightlessness on cardiac shape and left ventricular stress/strain distributions*. J Biomech Eng, 2013. **135**(12): p. 121008.
54. Summers, R.L., et al., *Ventricular chamber sphericity during spaceflight and parabolic flight intervals of less than 1 G*. Aviat Space Environ Med, 2010. **81**(5): p. 506-10.
55. Hughson, R.L., *Recent findings in cardiovascular physiology with space travel*. Respir Physiol Neurobiol, 2009. **169 Suppl 1**: p. S38-41.
56. Perhonen, M.A., et al., *Cardiac atrophy after bed rest and spaceflight*. J Appl Physiol (1985), 2001. **91**(2): p. 645-53.
57. Zhu, H., H. Wang, and Z. Liu, *Effects of real and simulated weightlessness on the cardiac and peripheral vascular functions of humans: A review*. Int J Occup Med Environ Health, 2015. **28**(5): p. 793-802.
58. Epstein, M., *Renal effects of head-out water immersion in humans: a 15-year update*. Physiol Rev, 1992. **72**(3): p. 563-621.
59. Fortney, S.M., et al., *Changes in body fluid compartments during a 28-day bed rest*. Aviat Space Environ Med, 1991. **62**(2): p. 97-104.
60. Hargens, A.R., et al., *Fluid shifts and muscle function in humans during acute simulated weightlessness*. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1983. **54**(4): p. 1003-9.
61. Norsk, P., *Gravitational stress and fluid volume regulation: a suggestion for revision of current hypotheses*. J Gravit Physiol, 1997. **4**(2): p. P85-8.
62. Summers, R.L., et al., *Computer systems analysis of spaceflight induced changes in left ventricular mass*. Comput Biol Med, 2007. **37**(3): p. 358-63.
63. Norsk, P., *Blood pressure regulation IV: adaptive responses to weightlessness*. Eur J Appl Physiol, 2014. **114**(3): p. 481-97.

64. Eckberg, D.L., et al., *Human vagal baroreflex mechanisms in space*. J Physiol, 2010. **588**(Pt 7): p. 1129-38.
65. Ertl, A.C., et al., *Human muscle sympathetic nerve activity and plasma noradrenaline kinetics in space*. J Physiol, 2002. **538**(Pt 1): p. 321-9.
66. Platts, S.H., et al., *Cardiovascular adaptations to long-duration head-down bed rest*. Aviat Space Environ Med, 2009. **80**(5 Suppl): p. A29-36.
67. Zuj, K.A., et al., *Impaired cerebrovascular autoregulation and reduced CO(2) reactivity after long duration spaceflight*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(12): p. H2592-8.
68. D'Aunno, D.S., et al., *Effect of short- and long-duration spaceflight on QTc intervals in healthy astronauts*. Am J Cardiol, 2003. **91**(4): p. 494-7.
69. Arbeille, P., et al., *Adaptation of the left heart, cerebral and femoral arteries, and jugular and femoral veins during short- and long-term head-down tilt and spaceflights*. Eur J Appl Physiol, 2001. **86**(2): p. 157-68.
70. Fomina, G.A., et al., *[Mechanisms of changes in human hemodynamics under the conditions of microgravity and prognosis of postflight orthostatic stability]*. Fiziol Cheloveka, 2008. **34**(3): p. 92-7.
71. Watenpaugh, D.E., et al., *Effects of spaceflight on human calf hemodynamics*. J Appl Physiol (1985), 2001. **90**(4): p. 1552-8.
72. Xi-Qing, S., *[Microgravity-induced cardiovascular deconditioning: mechanisms and countermeasures]*. Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi, 2012. **28**(6): p. 532-9.
73. Arbeille, P., et al., *Arterial and venous response to Tilt with LBNP test after a 60 day HDT bedrest (WISE study)*. J Gravit Physiol, 2007. **14**(1): p. P47-8.
74. Colleran, P.N., et al., *Alterations in skeletal perfusion with simulated microgravity: a possible mechanism for bone remodeling*. J Appl Physiol (1985), 2000. **89**(3): p. 1046-54.
75. Smith, S.M., et al., *Bone markers, calcium metabolism, and calcium kinetics during extended-duration space flight on the mir space station*. J Bone Miner Res, 2005. **20**(2): p. 208-18.
76. LeBlanc, A.D., et al., *Skeletal responses to space flight and the bed rest analog: a review*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2007. **7**(1): p. 33-47.
77. Leblanc, A.D., et al., *Bone mineral loss and recovery after 17 weeks of bed rest*. J Bone Miner Res, 1990. **5**(8): p. 843-50.
78. Shackelford, L.C., et al., *Resistance exercise as a countermeasure to disuse-induced bone loss*. J Appl Physiol (1985), 2004. **97**(1): p. 119-29.
79. Durbin, S.M., et al., *Resveratrol supplementation preserves long bone mass, microstructure, and strength in hindlimb-suspended old male rats*. J Bone Miner Metab, 2014. **32**(1): p. 38-47.
80. Lang, T., et al., *Towards human exploration of space: the THESEUS review series on muscle and bone research priorities*. NPJ Microgravity, 2017. **3**: p. 8.
81. Ohira, T., et al., *Responses of skeletal muscles to gravitational unloading and/or reloading*. J Physiol Sci, 2015. **65**(4): p. 293-310.
82. Akima, H., et al., *Effects of 20 days of bed rest on physiological cross-sectional area of human thigh and leg muscles evaluated by magnetic resonance imaging*. J Gravit Physiol, 1997. **4**(1): p. S15-21.
83. Kawakami, Y., et al., *Changes in muscle size, architecture, and neural activation after 20 days of bed rest with and without resistance exercise*. Eur J Appl Physiol, 2001. **84**(1-2): p. 7-12.

84. Berry, P., I. Berry, and C. Manelfe, *Magnetic resonance imaging evaluation of lower limb muscles during bed rest--a microgravity simulation model*. *Aviat Space Environ Med*, 1993. **64**(3 Pt 1): p. 212-8.
85. Convertino, V.A., et al., *Changes in volume, muscle compartment, and compliance of the lower extremities in man following 30 days of exposure to simulated microgravity*. *Aviat Space Environ Med*, 1989. **60**(7): p. 653-8.
86. Berg, H.E., L. Larsson, and P.A. Tesch, *Lower limb skeletal muscle function after 6 wk of bed rest*. *J Appl Physiol* (1985), 1997. **82**(1): p. 182-8.
87. Fitts, R.H., D.R. Riley, and J.J. Widrick, *Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity*. *Journal of Experimental Biology*, 2001. **204**(18): p. 3201-3208.
88. Lambertz, D., et al., *Effects of long-term spaceflight on mechanical properties of muscles in humans*. *J Appl Physiol* (1985), 2001. **90**(1): p. 179-88.
89. Edgerton, V.R., et al., *Sensorimotor adaptations to microgravity in humans*. *J Exp Biol*, 2001. **204**(Pt 18): p. 3217-24.
90. Gogia, P., et al., *Bed rest effect on extremity muscle torque in healthy men*. *Arch Phys Med Rehabil*, 1988. **69**(12): p. 1030-2.
91. LeBlanc, A., et al., *Calf muscle area and strength changes after five weeks of horizontal bed rest*. *Am J Sports Med*, 1988. **16**(6): p. 624-9.
92. Ferrando, A.A., et al., *Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and whole body protein synthesis*. *Am J Physiol*, 1996. **270**(4 Pt 1): p. E627-33.
93. Wang, X.D., et al., *Mechanical load-dependent regulation of satellite cell and fiber size in rat soleus muscle*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. **290**(4): p. C981-9.
94. de Boer, M.D., et al., *Effect of 5 weeks horizontal bed rest on human muscle thickness and architecture of weight bearing and non-weight bearing muscles*. *Eur J Appl Physiol*, 2008. **104**(2): p. 401-7.
95. Edgerton, V.R., et al., *Human fiber size and enzymatic properties after 5 and 11 days of spaceflight*. *J Appl Physiol* (1985), 1995. **78**(5): p. 1733-9.
96. Stein, T.P. and C.E. Wade, *Metabolic consequences of muscle disuse atrophy*. *J Nutr*, 2005. **135**(7): p. 1824S-1828S.
97. Chi, M.M., et al., *Effects of microgravity and tail suspension on enzymes of individual soleus and tibialis anterior fibers*. *J Appl Physiol* (1985), 1992. **73**(2 Suppl): p. 66S-73S.
98. Manchester, J.K., et al., *Effect of microgravity on metabolic enzymes of individual muscle fibers*. *FASEB J*, 1990. **4**(1): p. 55-63.
99. Ferretti, G., et al., *The interplay of central and peripheral factors in limiting maximal O<sub>2</sub> consumption in man after prolonged bed rest*. *J Physiol*, 1997. **501** ( Pt 3): p. 677-86.
100. Hikida, R.S., et al., *Structural and metabolic characteristics of human skeletal muscle following 30 days of simulated microgravity*. *Aviat Space Environ Med*, 1989. **60**(7): p. 664-70.
101. Langfort, J., et al., *Effects of acute and chronic hindlimb suspension on sensitivity and responsiveness to insulin in the rat soleus muscle*. *Biochem Cell Biol*, 1997. **75**(1): p. 41-4.
102. Ritz, P., et al., *Energy and substrate metabolism during a 42-day bed-rest in a head-down tilt position in humans*. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1998. **78**(4): p. 308-14.
103. Fitts, R.H., D.R. Riley, and J.J. Widrick, *Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle*. *J Appl Physiol* (1985), 2000. **89**(2): p. 823-39.



104. Bosma, M., et al., *Re-evaluating lipotoxic triggers in skeletal muscle: relating intramyocellular lipid metabolism to insulin sensitivity*. Prog Lipid Res, 2012. **51**(1): p. 36-49.
105. Nielsen, J., et al., *Increased subsarcolemmal lipids in type 2 diabetes: effect of training on localization of lipids, mitochondria, and glycogen in sedentary human skeletal muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(3): p. E706-13.
106. Dirks, M.L., et al., *One Week of Bed Rest Leads to Substantial Muscle Atrophy and Induces Whole-Body Insulin Resistance in the Absence of Skeletal Muscle Lipid Accumulation*. Diabetes, 2016. **65**(10): p. 2862-75.
107. Tappy, L., C. Binnert, and P. Schneiter, *Energy expenditure, physical activity and body-weight control*. Proc Nutr Soc, 2003. **62**(3): p. 663-6.
108. Bergouignan, A., et al., *Towards human exploration of space: The THESEUS review series on nutrition and metabolism research priorities*. NPJ Microgravity, 2016. **2**: p. 16029.
109. Matzinger, O., P. Schneiter, and L. Tappy, *Effects of fatty acids on exercise plus insulin-induced glucose utilization in trained and sedentary subjects*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(1): p. E125-31.
110. Stein, T.P., et al., *Energy expenditure and balance during spaceflight on the space shuttle*. Am J Physiol, 1999. **276**(6 Pt 2): p. R1739-48.
111. Heer, M., et al., *Nutrient supply during recent European missions*. Pflugers Arch, 2000. **441**(2-3 Suppl): p. R8-14.
112. Biolo, G., et al., *Positive energy balance is associated with accelerated muscle atrophy and increased erythrocyte glutathione turnover during 5 wk of bed rest*. Am J Clin Nutr, 2008. **88**(4): p. 950-8.
113. Blanc, S., et al., *Energy and water metabolism, body composition, and hormonal changes induced by 42 days of enforced inactivity and simulated weightlessness*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(12): p. 4289-97.
114. Guthold, R., et al., *Worldwide trends in insufficient physical activity from 2001 to 2016: a pooled analysis of 358 population-based surveys with 1.9 million participants*. Lancet Glob Health, 2018. **6**(10): p. e1077-e1086.
115. Bergouignan, A., et al., *Physical inactivity as the culprit of metabolic inflexibility: evidence from bed-rest studies*. J Appl Physiol (1985), 2011. **111**(4): p. 1201-10.
116. Stephens, B.R., et al., *Effects of 1 day of inactivity on insulin action in healthy men and women: interaction with energy intake*. Metabolism, 2011. **60**(7): p. 941-9.
117. Goodpaster, B.H. and L.M. Sparks, *Metabolic Flexibility in Health and Disease*. Cell Metab, 2017. **25**(5): p. 1027-1036.
118. Reaven, G.M., *Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease*. Diabetes, 1988. **37**(12): p. 1595-607.
119. Astrup, A., *The relevance of increased fat oxidation for body-weight management: metabolic inflexibility in the predisposition to weight gain*. Obes Rev, 2011. **12**(10): p. 859-65.
120. Kelley, D.E., et al., *Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 1): p. E1130-41.
121. Corpeleijn, E., et al., *Impaired skeletal muscle substrate oxidation in glucose-intolerant men improves after weight loss*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(5): p. 1025-32.
122. Faerch, K. and A. Vaag, *Metabolic inflexibility is a common feature of impaired fasting glycaemia and impaired glucose tolerance*. Acta Diabetol, 2011. **48**(4): p. 349-353.

123. Kelley, D.E. and L.J. Mandarino, *Hyperglycemia normalizes insulin-stimulated skeletal muscle glucose oxidation and storage in noninsulin-dependent diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1990. **86**(6): p. 1999-2007.
124. Kelley, D.E., M. Mookan, and L.J. Mandarino, *Intracellular defects in glucose metabolism in obese patients with NIDDM*. Diabetes, 1992. **41**(6): p. 698-706.
125. Kelley, D.E. and J.A. Simoneau, *Impaired free fatty acid utilization by skeletal muscle in non-insulin-dependent diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1994. **94**(6): p. 2349-56.
126. Bienso, R.S., et al., *GLUT4 and glycogen synthase are key players in bed rest-induced insulin resistance*. Diabetes, 2012. **61**(5): p. 1090-9.
127. Cree, M.G., et al., *Twenty-eight-day bed rest with hypercortisolemia induces peripheral insulin resistance and increases intramuscular triglycerides*. Metabolism, 2010. **59**(5): p. 703-10.
128. Guzzardi, M.A., et al., *The role of glucose, insulin and NEFA in regulating tissue triglyceride accumulation: Substrate cooperation in adipose tissue versus substrate competition in skeletal muscle*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2017. **27**(11): p. 956-963.
129. Heilbronn, L., S.R. Smith, and E. Ravussin, *Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2004. **28 Suppl 4**: p. S12-21.
130. Kelley, D.E., B.H. Goodpaster, and L. Storlien, *Muscle triglyceride and insulin resistance*. Annu Rev Nutr, 2002. **22**: p. 325-46.
131. Koska, J., et al., *Distribution of subcutaneous fat predicts insulin action in obesity in sex-specific manner*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(9): p. 2003-9.
132. Mazzucco, S., F. Agostini, and G. Biolo, *Inactivity-mediated insulin resistance is associated with upregulated pro-inflammatory fatty acids in human cell membranes*. Clin Nutr, 2010. **29**(3): p. 386-90.
133. Morino, K., K.F. Petersen, and G.I. Shulman, *Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction*. Diabetes, 2006. **55 Suppl 2**: p. S9-S15.
134. Rabol, R., et al., *Reversal of muscle insulin resistance with exercise reduces postprandial hepatic de novo lipogenesis in insulin resistant individuals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(33): p. 13705-9.
135. Mikines, K.J., et al., *Effect of 7 days of bed rest on dose-response relation between plasma glucose and insulin secretion*. Am J Physiol, 1989. **257**(1 Pt 1): p. E43-8.
136. Mikines, K.J., et al., *Seven days of bed rest decrease insulin action on glucose uptake in leg and whole body*. J Appl Physiol (1985), 1991. **70**(3): p. 1245-54.
137. Tabata, I., et al., *Resistance training affects GLUT-4 content in skeletal muscle of humans after 19 days of head-down bed rest*. J Appl Physiol (1985), 1999. **86**(3): p. 909-14.
138. Blanc, S., et al., *Fuel homeostasis during physical inactivity induced by bed rest*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(6): p. 2223-33.
139. Bergouignan, A., et al., *Effect of physical inactivity on the oxidation of saturated and monounsaturated dietary Fatty acids: results of a randomized trial*. PLoS Clin Trials, 2006. **1**(5): p. e27.
140. Bergouignan, A., et al., *Physical inactivity differentially alters dietary oleate and palmitate trafficking*. Diabetes, 2009. **58**(2): p. 367-76.
141. Sonne, M.P., et al., *Effect of 10 days of bedrest on metabolic and vascular insulin action: a study in individuals at risk for type 2 diabetes*. J Appl Physiol (1985), 2010. **108**(4): p. 830-7.

142. Frayling, T.M., *Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(9): p. 657-62.
143. Frayling, T.M., et al., *A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity*. Science, 2007. **316**(5826): p. 889-94.
144. O'Keefe M, P., et al., *Development of whole-body and skeletal muscle insulin resistance after one day of hindlimb suspension*. Metabolism, 2004. **53**(9): p. 1215-22.
145. Alibegovic, A.C., et al., *Insulin resistance induced by physical inactivity is associated with multiple transcriptional changes in skeletal muscle in young men*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **299**(5): p. E752-63.
146. Margaritis, I., et al., *Does antioxidant system adaptive response alleviate related oxidative damage with long term bed rest?* Clin Biochem, 2009. **42**(4-5): p. 371-9.
147. Alibegovic, A.C., et al., *Increased rate of whole body lipolysis before and after 9 days of bed rest in healthy young men born with low birth weight*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(3): p. E555-64.
148. Hojbjerg, L., et al., *Impact of physical inactivity on subcutaneous adipose tissue metabolism in healthy young male offspring of patients with type 2 diabetes*. Diabetes, 2010. **59**(11): p. 2790-8.
149. Bey, L. and M.T. Hamilton, *Suppression of skeletal muscle lipoprotein lipase activity during physical inactivity: a molecular reason to maintain daily low-intensity activity*. J Physiol, 2003. **551**(Pt 2): p. 673-82.
150. Kump, D.S. and F.W. Booth, *Sustained rise in triacylglycerol synthesis and increased epididymal fat mass when rats cease voluntary wheel running*. J Physiol, 2005. **565**(Pt 3): p. 911-25.
151. Kump, D.S., M.J. Laye, and F.W. Booth, *Increased mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase protein and enzyme activity in rat epididymal fat upon cessation of wheel running*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(3): p. E480-9.
152. Blanc, S., et al., *Fuel homeostasis during physical inactivity induced by bed rest*. The journal of clinical endocrinology & metabolism, 2000.
153. DeLany, J.P., et al., *Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans*. Am J Clin Nutr, 2000. **72**(4): p. 905-11.
154. Stein, T.P., *Weight, muscle and bone loss during space flight: another perspective*. Eur J Appl Physiol, 2013. **113**(9): p. 2171-81.
155. Stein, T., et al., *Energy metabolism pathways in rat muscle under conditions of simulated microgravity*. J Nutr Biochem, 2002. **13**(8): p. 471.
156. Stein, T.P., et al., *Effect of hind limb muscle unloading on liver metabolism of rats*. J Nutr Biochem, 2005. **16**(1): p. 9-16.
157. Rector, R.S., et al., *Cessation of daily exercise dramatically alters precursors of hepatic steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats*. J Physiol, 2008. **586**(17): p. 4241-9.
158. Storz, P., et al., *Cross-talk mechanisms in the development of insulin resistance of skeletal muscle cells palmitate rather than tumour necrosis factor inhibits insulin-dependent protein kinase B (PKB)/Akt stimulation and glucose uptake*. Eur J Biochem, 1999. **266**(1): p. 17-25.
159. Shulman, G.I., *Cellular mechanisms of insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**(2): p. 171-6.
160. Rector, R.S. and J.P. Thyfault, *Does physical inactivity cause nonalcoholic fatty liver disease?* J Appl Physiol (1985), 2011. **111**(6): p. 1828-35.

161. Stettler, R., et al., *Interaction between dietary lipids and physical inactivity on insulin sensitivity and on intramyocellular lipids in healthy men*. *Diabetes Care*, 2005. **28**(6): p. 1404-9.
162. Trudel, G., et al., *Bone marrow fat accumulation after 60 days of bed rest persisted 1 year after activities were resumed along with hemopoietic stimulation: the Women International Space Simulation for Exploration study*. *J Appl Physiol* (1985), 2009. **107**(2): p. 540-8.
163. Rector, R.S., et al., *Daily exercise increases hepatic fatty acid oxidation and prevents steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008. **294**(3): p. G619-26.
164. Sattar, N., et al., *Elevated alanine aminotransferase predicts new-onset type 2 diabetes independently of classical risk factors, metabolic syndrome, and C-reactive protein in the west of Scotland coronary prevention study*. *Diabetes*, 2004. **53**(11): p. 2855-60.
165. Rudwill, F., et al., *Effect of enforced physical inactivity induced by 60-day of bed rest on hepatic markers of NAFLD in healthy normal-weight women*. *Liver Int*, 2015. **35**(6): p. 1700-6.
166. Anty, R., et al., *A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2010. **32**(11-12): p. 1315-22.
167. Yilmaz, Y., A.E. Kedrah, and O. Ozdogan, *Cytokeratin-18 fragments and biomarkers of the metabolic syndrome in nonalcoholic steatohepatitis*. *World J Gastroenterol*, 2009. **15**(35): p. 4387-91.
168. Li, C., *A tale of two angiopoietin-like proteins*. *Curr Opin Lipidol*, 2007. **18**(5): p. 597-9.
169. Yilmaz, Y., et al., *Serum concentrations of human angiopoietin-like protein 3 in patients with nonalcoholic fatty liver disease: association with insulin resistance*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2009. **21**(11): p. 1247-51.
170. Blanc, S., et al., *Leptin responses to physical inactivity induced by simulated weightlessness*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2000. **279**(3): p. R891-8.
171. Rynders, C.A., et al., *Sedentary behaviour is a key determinant of metabolic inflexibility*. *J Physiol*, 2018. **596**(8): p. 1319-1330.
172. Kelley, D.E., et al., *Effects of insulin on skeletal muscle glucose storage, oxidation, and glycolysis in humans*. *Am J Physiol*, 1990. **258**(6 Pt 1): p. E923-9.
173. Heilbronn, L.K., et al., *Impaired fat oxidation after a single high-fat meal in insulin-sensitive nondiabetic individuals with a family history of type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2007. **56**(8): p. 2046-53.
174. Galgani, J.E., C. Moro, and E. Ravussin, *Metabolic flexibility and insulin resistance*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008. **295**(5): p. E1009-17.
175. Bergouignan, A., et al., *Effect of contrasted levels of habitual physical activity on metabolic flexibility*. *J Appl Physiol* (1985), 2013. **114**(3): p. 371-9.
176. Charles, J.B. and C.M. Lathers, *Summary of lower body negative pressure experiments during space flight*. *J Clin Pharmacol*, 1994. **34**(6): p. 571-83.
177. LeBlanc, A., et al., *Bone mineral and lean tissue loss after long duration space flight*. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2000. **1**(2): p. 157-60.
178. Lang, T., et al., *Cortical and trabecular bone mineral loss from the spine and hip in long-duration spaceflight*. *J Bone Miner Res*, 2004. **19**(6): p. 1006-12.
179. Smith, S.M., et al., *Benefits for bone from resistance exercise and nutrition in long-duration spaceflight: Evidence from biochemistry and densitometry*. *J Bone Miner Res*, 2012. **27**(9): p. 1896-906.

180. Kozlovskaya, I.B., et al., *Russian Countermeasure Systems for Adverse Effects of Microgravity on Long-Duration ISS Flights*. *Aerosp Med Hum Perform*, 2015. **86**(12 Suppl): p. A24-A31.
181. Loehr, J.A., et al., *Musculoskeletal adaptations to training with the advanced resistive exercise device*. *Med Sci Sports Exerc*, 2011. **43**(1): p. 146-56.
182. Smith, S.M., et al., *Men and women in space: bone loss and kidney stone risk after long-duration spaceflight*. *J Bone Miner Res*, 2014. **29**(7): p. 1639-45.
183. Nikawa, T., et al., *Skeletal muscle gene expression in space-flown rats*. *FASEB J*, 2004. **18**(3): p. 522-4.
184. Miokovic, T., et al., *Muscle atrophy, pain, and damage in bed rest reduced by resistive (vibration) exercise*. *Med Sci Sports Exerc*, 2014. **46**(8): p. 1506-16.
185. Alkner, B.A. and P.A. Tesch, *Efficacy of a gravity-independent resistance exercise device as a countermeasure to muscle atrophy during 29-day bed rest*. *Acta Physiol Scand*, 2004. **181**(3): p. 345-57.
186. Linnarsson, D., et al., *Effects of an artificial gravity countermeasure on orthostatic tolerance, blood volumes and aerobic power after short-term bed rest (BR-AG1)*. *J Appl Physiol* (1985), 2015. **118**(1): p. 29-35.
187. Clement, G. and A. Pavy-Le Traon, *Centrifugation as a countermeasure during actual and simulated microgravity: a review*. *Eur J Appl Physiol*, 2004. **92**(3): p. 235-48.
188. Zwart, S.R., et al., *Lower body negative pressure treadmill exercise as a countermeasure for bed rest-induced bone loss in female identical twins*. *Bone*, 2007. **40**(2): p. 529-37.
189. Bergouignan, A., et al., *Regulation of energy balance during long-term physical inactivity induced by bed rest with and without exercise training*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010. **95**(3): p. 1045-53.
190. LeBlanc, A.D., et al., *Alendronate as an effective countermeasure to disuse induced bone loss*. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2002. **2**(4): p. 335-43.
191. Meunier, P.J., et al., *Intravenous disodium etidronate therapy in Paget's disease of bone and hypercalcemia of malignancy. Effects on biochemical parameters and bone histomorphometry*. *Am J Med*, 1987. **82**(2A): p. 71-8.
192. Leblanc, A., et al., *Bisphosphonates as a supplement to exercise to protect bone during long-duration spaceflight*. *Osteoporos Int*, 2013. **24**(7): p. 2105-14.
193. Strollo, F., et al., *The effect of microgravity on testicular androgen secretion*. *Aviat Space Environ Med*, 1998. **69**(2): p. 133-6.
194. Wimalawansa, S.M. and S.J. Wimalawansa, *Simulated weightlessness-induced attenuation of testosterone production may be responsible for bone loss*. *Endocrine*, 1999. **10**(3): p. 253-60.
195. Smith, S.M., et al., *Long-duration space flight and bed rest effects on testosterone and other steroids*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012. **97**(1): p. 270-8.
196. Zwart, S.R., et al., *Capacity of omega-3 fatty acids or eicosapentaenoic acid to counteract weightlessness-induced bone loss by inhibiting NF-kappaB activation: from cells to bed rest to astronauts*. *J Bone Miner Res*, 2010. **25**(5): p. 1049-57.
197. Stein, T.P. and S. Blanc, *Does protein supplementation prevent muscle disuse atrophy and loss of strength?* *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2011. **51**(9): p. 828-34.
198. Zwart, S.R., A.R. Hargens, and S.M. Smith, *The ratio of animal protein intake to potassium intake is a predictor of bone resorption in space flight analogues and in ambulatory subjects*. *Am J Clin Nutr*, 2004. **80**(4): p. 1058-65.
199. Buehlmeier, J., et al., *Alkaline salts to counteract bone resorption and protein wasting induced by high salt intake: results of a randomized controlled trial*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012. **97**(12): p. 4789-97.

200. Smith, G.I., et al., *Dietary omega-3 fatty acid supplementation increases the rate of muscle protein synthesis in older adults: a randomized controlled trial*. Am J Clin Nutr, 2011. **93**(2): p. 402-12.
201. Faeh, D., et al., *Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men*. Diabetes, 2005. **54**(7): p. 1907-13.
202. Gupta, V., et al., *Oily fish, coffee and walnuts: Dietary treatment for nonalcoholic fatty liver disease*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(37): p. 10621-35.
203. Azzi, A., et al., *Vitamin E mediates cell signaling and regulation of gene expression*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1031**: p. 86-95.
204. Hemdan, D.I., et al., *Polyphenols prevent clinorotation-induced expression of atrogenes in mouse C2C12 skeletal myotubes*. J Med Invest, 2009. **56**(1-2): p. 26-32.
205. Servais, S., et al., *Prevention of unloading-induced atrophy by vitamin E supplementation: links between oxidative stress and soleus muscle proteolysis?* Free Radic Biol Med, 2007. **42**(5): p. 627-35.
206. Ikemoto, M., et al., *A relative high dose of vitamin E does not attenuate unweighting-induced oxidative stress and ubiquitination in rat skeletal muscle*. J Physiol Anthropol Appl Human Sci, 2002. **21**(5): p. 257-63.
207. Kondo, H., et al., *Trace element movement and oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization*. Am J Physiol, 1992. **262**(5 Pt 1): p. E583-90.
208. Ikemoto, M., et al., *Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin-proteasome pathway*. FASEB J, 2001. **15**(7): p. 1279-81.
209. Bodine, S.C., et al., *Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy*. Science, 2001. **294**(5547): p. 1704-8.
210. Gomes, M.D., et al., *Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(25): p. 14440-5.
211. Bar-Shai, M., et al., *Exercise and immobilization in aging animals: the involvement of oxidative stress and NF-kappaB activation*. Free Radic Biol Med, 2008. **44**(2): p. 202-14.
212. Hirasaka, K., et al., *Isoflavones derived from soy beans prevent MuRF1-mediated muscle atrophy in C2C12 myotubes through SIRT1 activation*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2013. **59**(4): p. 317-24.
213. Mukai, R., et al., *Quercetin prevents unloading-derived disused muscle atrophy by attenuating the induction of ubiquitin ligases in tail-suspension mice*. J Nat Prod, 2010. **73**(10): p. 1708-10.
214. Momken, I., et al., *Resveratrol prevents the wasting disorders of mechanical unloading by acting as a physical exercise mimetic in the rat*. FASEB J, 2011. **25**(10): p. 3646-60.
215. Novelle, M.G., et al., *Resveratrol supplementation: Where are we now and where should we go?* Ageing Res Rev, 2015. **21**: p. 1-15.
216. Ross, R., *Atherosclerosis is an inflammatory disease*. Am Heart J, 1999. **138**(5 Pt 2): p. S419-20.
217. Murer, S.B., et al., *Antioxidant supplements reduced oxidative stress and stabilized liver function tests but did not reduce inflammation in a randomized controlled trial in obese children and adolescents*. J Nutr, 2014. **144**(2): p. 193-201.
218. Bergouignan, A., et al., *Metabolic fate of saturated and monounsaturated dietary fats: the Mediterranean diet revisited from epidemiological evidence to cellular mechanisms*. Prog Lipid Res, 2009. **48**(3-4): p. 128-47.

219. Trichopoulou, A., C. Bamia, and D. Trichopoulos, *Anatomy of health effects of Mediterranean diet: Greek EPIC prospective cohort study*. *BMJ*, 2009. **338**: p. b2337.
220. Trichopoulou, A., et al., *Definitions and potential health benefits of the Mediterranean diet: views from experts around the world*. *BMC Med*, 2014. **12**: p. 112.
221. Steckhan, N., et al., *Effects of different dietary approaches on inflammatory markers in patients with metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis*. *Nutrition*, 2016. **32**(3): p. 338-48.
222. Lutt, W.W., Z. Ming, and D.J. Legare, *Attenuation of age- and sucrose-induced insulin resistance and syndrome X by a synergistic antioxidant cocktail: the AMIS syndrome and HISS hypothesis*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010. **88**(3): p. 313-23.
223. Wang, H.H., K.K. Chowdhury, and W.W. Lutt, *A synergistic, balanced antioxidant cocktail, protects aging rats from insulin resistance and absence of meal-induced insulin sensitization (AMIS) syndrome*. *Molecules*, 2015. **20**(1): p. 669-82.
224. Hokayem, M., et al., *Grape polyphenols prevent fructose-induced oxidative stress and insulin resistance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients*. *Diabetes Care*, 2013. **36**(6): p. 1454-61.
225. Bakker, G.C., et al., *An antiinflammatory dietary mix modulates inflammation and oxidative and metabolic stress in overweight men: a nutrigenomics approach*. *Am J Clin Nutr*, 2010. **91**(4): p. 1044-59.
226. Ebrahimi, F.A., et al., *The Effects of Omega-3 Fatty Acids and Vitamin E Co-Supplementation on Indices of Insulin Resistance and Hormonal Parameters in Patients with Polycystic Ovary Syndrome: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2017. **125**(6): p. 353-359.
227. McAnulty, L.S., et al., *Effect of resveratrol and quercetin supplementation on redox status and inflammation after exercise*. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2013. **38**(7): p. 760-5.
228. Katzmarzyk, P.T., *Physical activity, sedentary behavior, and health: paradigm paralysis or paradigm shift?* *Diabetes*, 2010. **59**(11): p. 2717-25.
229. Bouchard, C., S.N. Blair, and P.T. Katzmarzyk, *Less Sitting, More Physical Activity, or Higher Fitness?* *Mayo Clin Proc*, 2015. **90**(11): p. 1533-40.
230. Lees, S.J. and F.W. Booth, *Sedentary death syndrome*. *Can J Appl Physiol*, 2004. **29**(4): p. 447-60; discussion 444-6.
231. Ding, D., et al., *The economic burden of physical inactivity: a global analysis of major non-communicable diseases*. *Lancet*, 2016. **388**(10051): p. 1311-24.
232. Narici, M.V. and M.D. de Boer, *Disuse of the musculo-skeletal system in space and on earth*. *Eur J Appl Physiol*, 2011. **111**(3): p. 403-20.
233. Mutin-Carnino, M., et al., *Effect of muscle unloading, reloading and exercise on inflammation during a head-down bed rest*. *Int J Sports Med*, 2014. **35**(1): p. 28-34.
234. Powers, S.K., et al., *Redox control of skeletal muscle atrophy*. *Free Radic Biol Med*, 2016. **98**: p. 208-217.
235. Rudwill, F., et al., *Metabolic Inflexibility Is an Early Marker of Bed-Rest-Induced Glucose Intolerance Even When Fat Mass Is Stable*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018. **103**(5): p. 1910-1920.
236. Krogh-Madsen, R., et al., *A 2-wk reduction of ambulatory activity attenuates peripheral insulin sensitivity*. *J Appl Physiol* (1985), 2010. **108**(5): p. 1034-40.
237. Olsen, R.H., et al., *Metabolic responses to reduced daily steps in healthy nonexercising men*. *JAMA*, 2008. **299**(11): p. 1261-3.
238. Knudsen, S.H., et al., *Changes in insulin sensitivity precede changes in body composition during 14 days of step reduction combined with overfeeding in healthy young men*. *J Appl Physiol* (1985), 2012. **113**(1): p. 7-15.

239. Alkhalidy, H., Y. Wang, and D. Liu, *Dietary Flavonoids in the Prevention of T2D: An Overview*. *Nutrients*, 2018. **10**(4).
240. Guasch-Ferre, M., et al., *Dietary Polyphenols, Mediterranean Diet, Prediabetes, and Type 2 Diabetes: A Narrative Review of the Evidence*. *Oxid Med Cell Longev*, 2017. **2017**: p. 6723931.
241. Woerdeman, J., et al., *Do grape polyphenols improve metabolic syndrome components? A systematic review*. *Eur J Clin Nutr*, 2017. **71**(12): p. 1381-1392.
242. Stull, A.J., *Blueberries' Impact on Insulin Resistance and Glucose Intolerance*. *Antioxidants (Basel)*, 2016. **5**(4).
243. Mao, X., et al., *Oxidative stress-induced diseases and tea polyphenols*. *Oncotarget*, 2017. **8**(46): p. 81649-81661.
244. Hussain, T., et al., *Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?* *Oxid Med Cell Longev*, 2016. **2016**: p. 7432797.
245. Sosnowska, B., P. Penson, and M. Banach, *The role of nutraceuticals in the prevention of cardiovascular disease*. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2017. **7**(Suppl 1): p. S21-S31.
246. Murillo, A.G. and M.L. Fernandez, *The Relevance of Dietary Polyphenols in Cardiovascular Protection*. *Curr Pharm Des*, 2017. **23**(17): p. 2444-2452.
247. Mukai, R., et al., *8-Prenylnaringenin promotes recovery from immobilization-induced disuse muscle atrophy through activation of the Akt phosphorylation pathway in mice*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2016. **311**(6): p. R1022-R1031.
248. Mukai, R., et al., *Preventive effect of dietary quercetin on disuse muscle atrophy by targeting mitochondria in denervated mice*. *J Nutr Biochem*, 2016. **31**: p. 67-76.
249. Meador, B.M., et al., *The Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate (EGCg) Attenuates Skeletal Muscle Atrophy in a Rat Model of Sarcopenia*. *J Frailty Aging*, 2015. **4**(4): p. 209-15.
250. Alway, S.E., et al., *Green tea extract attenuates muscle loss and improves muscle function during disuse, but fails to improve muscle recovery following unloading in aged rats*. *J Appl Physiol (1985)*, 2015. **118**(3): p. 319-30.
251. Mizunoya, W., et al., *Fast-to-slow shift of muscle fiber-type composition by dietary apple polyphenols in rats: Impact of the low-dose supplementation*. *Anim Sci J*, 2017. **88**(3): p. 489-499.
252. Onishi, S., et al., *Green tea extracts ameliorate high-fat diet-induced muscle atrophy in senescence-accelerated mouse prone-8 mice*. *PLoS One*, 2018. **13**(4): p. e0195753.
253. Lambert, K., et al., *Grape polyphenols supplementation reduces muscle atrophy in a mouse model of chronic inflammation*. *Nutrition*, 2015. **31**(10): p. 1275-83.
254. Huey, K.A., et al., *In vivo vitamin E administration attenuates interleukin-6 and interleukin-1beta responses to an acute inflammatory insult in mouse skeletal and cardiac muscle*. *Exp Physiol*, 2008. **93**(12): p. 1263-72.
255. Khor, S.C., et al., *Vitamin E in sarcopenia: current evidences on its role in prevention and treatment*. *Oxid Med Cell Longev*, 2014. **2014**: p. 914853.
256. Alcala, M., et al., *Vitamin E reduces adipose tissue fibrosis, inflammation, and oxidative stress and improves metabolic profile in obesity*. *Obesity (Silver Spring)*, 2015. **23**(8): p. 1598-606.
257. Cesari, M., et al., *Antioxidants and physical performance in elderly persons: the Invecchiare in Chianti (InCHIANTI) study*. *Am J Clin Nutr*, 2004. **79**(2): p. 289-94.
258. Ble, A., et al., *Lower plasma vitamin E levels are associated with the frailty syndrome: the InCHIANTI study*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2006. **61**(3): p. 278-83.



259. Passerieux, E., et al., *Effects of vitamin C, vitamin E, zinc gluconate, and selenomethionine supplementation on muscle function and oxidative stress biomarkers in patients with facioscapulohumeral dystrophy: a double-blind randomized controlled clinical trial*. *Free Radic Biol Med*, 2015. **81**: p. 158-69.
260. Tabrizi, R., et al., *The Effects of Selenium Supplementation on Glucose Metabolism and Lipid Profiles Among Patients with Metabolic Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials*. *Horm Metab Res*, 2017. **49**(11): p. 826-830.
261. Farrokhian, A., et al., *Selenium Supplementation Affects Insulin Resistance and Serum hs-CRP in Patients with Type 2 Diabetes and Coronary Heart Disease*. *Horm Metab Res*, 2016. **48**(4): p. 263-8.
262. Hodson, L., et al., *Docosahexaenoic acid enrichment in NAFLD is associated with improvements in hepatic metabolism and hepatic insulin sensitivity: a pilot study*. *Eur J Clin Nutr*, 2017. **71**(8): p. 973-979.
263. Ng, T.W., et al., *Atorvastatin plus omega-3 fatty acid ethyl ester decreases very-low-density lipoprotein triglyceride production in insulin resistant obese men*. *Diabetes Obes Metab*, 2014. **16**(6): p. 519-26.
264. Buoite Stella, A., et al., *Update on the Impact of Omega 3 Fatty Acids on Inflammation, Insulin Resistance and Sarcopenia: A Review*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(1).
265. Smith, H.J., N.A. Greenberg, and M.J. Tisdale, *Effect of eicosapentaenoic acid, protein and amino acids on protein synthesis and degradation in skeletal muscle of cachectic mice*. *Br J Cancer*, 2004. **91**(2): p. 408-12.
266. Smith, G.I., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids augment the muscle protein anabolic response to hyperinsulinaemia-hyperaminoacidaemia in healthy young and middle-aged men and women*. *Clin Sci (Lond)*, 2011. **121**(6): p. 267-78.
267. Mirza, K.A., et al., *In vitro assessment of the combined effect of eicosapentaenoic acid, green tea extract and curcumin C3 on protein loss in C2C12 myotubes*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2016. **52**(8): p. 838-45.
268. Udupa, A.S., et al., *Study of comparative effects of antioxidants on insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus*. *J Clin Diagn Res*, 2012. **6**(9): p. 1469-73.
269. Guertin, K.A., et al., *Effect of long-term vitamin E and selenium supplementation on urine F2-isoprostanes, a biomarker of oxidative stress*. *Free Radic Biol Med*, 2016. **95**: p. 349-56.
270. Wang, H., et al., *Skeletal muscle atrophy is attenuated in tumor-bearing mice under chemotherapy by treatment with fish oil and selenium*. *Oncotarget*, 2015. **6**(10): p. 7758-73.
271. Most, J., et al., *Combined epigallocatechin-3-gallate and resveratrol supplementation for 12 wk increases mitochondrial capacity and fat oxidation, but not insulin sensitivity, in obese humans: a randomized controlled trial*. *Am J Clin Nutr*, 2016. **104**(1): p. 215-27.
272. Ngo Sock, E.T., et al., *Effects of a short-term overfeeding with fructose or glucose in healthy young males*. *Br J Nutr*, 2010. **103**(7): p. 939-43.
273. Tappy, L., et al., *Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions*. *Nutrition*, 2010. **26**(11-12): p. 1044-9.
274. Myburgh, K.H., *Polyphenol supplementation: benefits for exercise performance or oxidative stress?* *Sports Med*, 2014. **44 Suppl 1**: p. S57-70.
275. Somerville, V., C. Bringans, and A. Braakhuis, *Polyphenols and Performance: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *Sports Med*, 2017. **47**(8): p. 1589-1599.

276. Manach, C., et al., *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies*. Am J Clin Nutr, 2005. **81**(1 Suppl): p. 230S-242S.
277. Bastian, T., et al., *Automatic identification of physical activity types and sedentary behaviors from triaxial accelerometer: laboratory-based calibrations are not enough*. J Appl Physiol (1985), 2015. **118**(6): p. 716-22.
278. Garnotel, M., et al., *Prior automatic posture and activity identification improves physical activity energy expenditure prediction from hip-worn triaxial accelerometry*. J Appl Physiol (1985), 2018. **124**(3): p. 780-790.
279. 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.
280. Bergouignan, L., et al., *Breast cancer affects both the hippocampus volume and the episodic autobiographical memory retrieval*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25349.
281. Lefai, E., et al., *Exercise training improves fat metabolism independent of total energy expenditure in sedentary overweight men, but does not restore lean metabolic phenotype*. Int J Obes (Lond), 2017.
282. Yilmaz O, et al., *A Practical HPLC Method to Measure Reduced (GSH) and Oxidized (GSSG) Glutathione Concentrations in Animal Tissues*. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2009.
283. Tüközkan N, Erdamar H, and S. I., *Measurement of Total Malondialdehyde in Plasma and Tissues by High-Performance Liquid Chromatography and Thiobarbituric Acid Assay*. Firat Tip Dergisi, 2006.
284. Rifler, J.P., et al., *A moderate red wine intake improves blood lipid parameters and erythrocytes membrane fluidity in post myocardial infarct patients*. Mol Nutr Food Res, 2012. **56**(2): p. 345-51.
285. Kenny, H.C., et al., *Bed rest and resistive vibration exercise unveil novel links between skeletal muscle mitochondrial function and insulin resistance*. Diabetologia, 2017. **60**(8): p. 1491-1501.
286. Hansen, K.B., et al., *Reduced glucose tolerance and insulin resistance induced by steroid treatment, relative physical inactivity, and high-calorie diet impairs the incretin effect in healthy subjects*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(7): p. 3309-17.
287. Arciero, P.J., D.L. Smith, and J. Calles-Escandon, *Effects of short-term inactivity on glucose tolerance, energy expenditure, and blood flow in trained subjects*. J Appl Physiol (1985), 1998. **84**(4): p. 1365-73.
288. Hansen, K.B., et al., *Increased postprandial GIP and glucagon responses, but unaltered GLP-1 response after intervention with steroid hormone, relative physical inactivity, and high-calorie diet in healthy subjects*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(2): p. 447-53.
289. Mikus, C.R., et al., *Lowering physical activity impairs glycemic control in healthy volunteers*. Med Sci Sports Exerc, 2012. **44**(2): p. 225-31.
290. Holwerda, S.W., et al., *The influence of reduced insulin sensitivity via short-term reductions in physical activity on cardiac baroreflex sensitivity during acute hyperglycemia*. J Appl Physiol (1985), 2015. **119**(12): p. 1383-92.
291. Reynolds, L.J., et al., *Acute inactivity impairs glycemic control but not blood flow to glucose ingestion*. Med Sci Sports Exerc, 2015. **47**(5): p. 1087-94.
292. Jurdana, M., et al., *Impact of 14-day bed rest on serum adipokines and low-grade inflammation in younger and older adults*. Age (Dordr), 2015. **37**(6): p. 116.
293. Bergouignan, A., et al., *Activity energy expenditure is a major determinant of dietary fat oxidation and trafficking, but the deleterious effect of detraining is more marked*

- than the beneficial effect of training at current recommendations. *Am J Clin Nutr*, 2013. **98**(3): p. 648-58.
294. Bondia-Pons, I., et al., *Isoenergetic diets differing in their n-3 fatty acid and polyphenol content reflect different plasma and HDL-fraction lipidomic profiles in subjects at high cardiovascular risk*. *Mol Nutr Food Res*, 2014. **58**(9): p. 1873-82.
  295. Annuzzi, G., et al., *Diets naturally rich in polyphenols improve fasting and postprandial dyslipidemia and reduce oxidative stress: a randomized controlled trial*. *Am J Clin Nutr*, 2014. **99**(3): p. 463-71.
  296. Hodson, L., et al., *Docosahexaenoic acid enrichment in NAFLD is associated with improvements in hepatic metabolism and hepatic insulin sensitivity: a pilot study*. *Eur J Clin Nutr*, 2017.
  297. Narayanankutty, A., et al., *Vitamin E supplementation modulates the biological effects of omega-3 fatty acids in naturally aged rats*. *Toxicol Mech Methods*, 2017. **27**(3): p. 207-214.
  298. Mendez, L., et al., *Changes in liver proteins of rats fed standard and high-fat and sucrose diets induced by fish omega-3 PUFAs and their combination with grape polyphenols according to quantitative proteomics*. *J Nutr Biochem*, 2017. **41**: p. 84-97.
  299. Rodriguez-Ramiro, I., D. Vauzour, and A.M. Miniñane, *Polyphenols and non-alcoholic fatty liver disease: impact and mechanisms*. *Proc Nutr Soc*, 2016. **75**(1): p. 47-60.
  300. Yetiv, J.Z., *Clinical applications of fish oils*. *JAMA*, 1988. **260**(5): p. 665-70.
  301. Chorner, Z., et al., *Dietary alpha-linolenic acid supplementation alters skeletal muscle plasma membrane lipid composition, sarcolemmal FAT/CD36 abundance, and palmitate transport rates*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2016. **311**(6): p. R1234-R1242.
  302. Ota, N., et al., *Effects of combination of regular exercise and tea catechins intake on energy expenditure in humans*. *Journal of Health Science*, 2004. **51**(2): p. 233-236.
  303. Chopard, A., S. Hillock, and B.J. Jasmin, *Molecular events and signalling pathways involved in skeletal muscle disuse-induced atrophy and the impact of countermeasures*. *J Cell Mol Med*, 2009. **13**(9B): p. 3032-50.
  304. Soni, N.K., et al., *Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acid-Enriched High Fat Diet Delays Skeletal Muscle Degradation in Mice*. *Nutrients*, 2016. **8**(9).
  305. Pisot, R., et al., *Whole muscle contractile parameters and thickness loss during 35-day bed rest*. *Eur J Appl Physiol*, 2008. **104**(2): p. 409-14.
  306. Rittweger, J., et al., *Bone loss in the lower leg during 35 days of bed rest is predominantly from the cortical compartment*. *Bone*, 2009. **44**(4): p. 612-8.
  307. Bruunsgaard, H. and B.K. Pedersen, *Age-related inflammatory cytokines and disease*. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2003. **23**(1): p. 15-39.
  308. Havel, P.J., *Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin*. *Curr Opin Lipidol*, 2002. **13**(1): p. 51-9.
  309. Buehlmeier, J., et al., *A combination of whey protein and potassium bicarbonate supplements during head-down-tilt bed rest: presentation of a multidisciplinary randomized controlled trial (MEP study)*. *Acta Astronautica*, 2013.
  310. Rudwill, F., et al., *Metabolic inflexibility is an early marker of bed-rest induced glucose intolerance even when fat mass is stable*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018.
  311. Kim, H., et al., *Comparative MR study of hepatic fat quantification using single-voxel proton spectroscopy, two-point dixon and three-point IDEAL*. *Magn Reson Med*, 2008. **59**(3): p. 521-7.

312. Ferrannini, E., *The theoretical bases of indirect calorimetry: a review*. Metabolism, 1988. **37**(3): p. 287-301.
313. Frayn, K.N., *Calculation of substrate oxidation rates in vivo from gaseous exchange*. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1983. **55**(2): p. 628-34.
314. Lefai, E., et al., *Exercise training improves fat metabolism independent of total energy expenditure in sedentary overweight men, but does not restore lean metabolic phenotype*. Int J Obes (Lond), 2017. **41**(12): p. 1728-1736.
315. Kelly, A.S., et al., *Relation of circulating oxidized LDL to obesity and insulin resistance in children*. Pediatr Diabetes, 2010. **11**(8): p. 552-5.
316. Sinaiko, A.R., et al., *Relation of body mass index and insulin resistance to cardiovascular risk factors, inflammatory factors, and oxidative stress during adolescence*. Circulation, 2005. **111**(15): p. 1985-91.
317. Evans, J.L., et al., *Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes*. Endocr Rev, 2002. **23**(5): p. 599-622.
318. Evans, J.L., et al., *Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction?* Diabetes, 2003. **52**(1): p. 1-8.
319. Lo, J.C., et al., *Adipsin is an adipokine that improves beta cell function in diabetes*. Cell, 2014. **158**(1): p. 41-53.
320. Coker, R.H., et al., *Bed rest worsens impairments in fat and glucose metabolism in older, overweight adults*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2014. **69**(3): p. 363-70.
321. Meex, R.C., et al., *Restoration of muscle mitochondrial function and metabolic flexibility in type 2 diabetes by exercise training is paralleled by increased myocellular fat storage and improved insulin sensitivity*. Diabetes, 2010. **59**(3): p. 572-9.
322. Bo, S., et al., *Six months of resveratrol supplementation has no measurable effect in type 2 diabetic patients. A randomized, double blind, placebo-controlled trial*. Pharmacol Res, 2016. **111**: p. 896-905.
323. Ponzio, V., L. Soldati, and S. Bo, *Resveratrol: a supplementation for men or for mice?* J Transl Med, 2014. **12**: p. 158.
324. Visioli, F., *The resveratrol fiasco*. Pharmacol Res, 2014. **90**: p. 87.
325. Gliemann, L., M. Nyberg, and Y. Hellsten, *Effects of exercise training and resveratrol on vascular health in aging*. Free Radic Biol Med, 2016. **98**: p. 165-176.
326. Ploutz-Snyder, L.L., et al., *Exercise Training Mitigates Multisystem Deconditioning during Bed Rest*. Med Sci Sports Exerc, 2018. **50**(9): p. 1920-1928.

Annexe 1: Metabolic inflexibility is an early marker of bed-rest induced glucose intolerance even when fat mass is stable

## Metabolic Inflexibility Is an Early Marker of Bed-Rest-Induced Glucose Intolerance Even When Fat Mass Is Stable

Floriane Rudwill,<sup>1\*</sup> Donal O’Gorman,<sup>2,3\*</sup> Etienne Lefai,<sup>4</sup> Isabelle Chery,<sup>1</sup> Alexandre Zahariev,<sup>1</sup> Sylvie Normand,<sup>5</sup> Allan F. Pagano,<sup>6</sup> Angèle Chopard,<sup>6</sup> Anthony Damiot,<sup>1</sup> Claire Laurens,<sup>1</sup> Leanne Hodson,<sup>7</sup> Emmanuelle Canet-Soulas,<sup>4</sup> Martina Heer,<sup>8</sup> Petra Frings Meuthen,<sup>9</sup> Judith Buehlmeier,<sup>9,10</sup> Natalie Baecker,<sup>9</sup> Laure Meiller,<sup>4,5</sup> Guillemette Gauquelin-Koch,<sup>11</sup> Stéphane Blanc,<sup>1\*</sup> Chantal Simon,<sup>4,5\*</sup> and Audrey Bergouignan<sup>1,12,13\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, Strasbourg 67087, France; <sup>2</sup>3U Diabetes Consortium, Dublin City University, Dublin D09 NR58, Ireland; <sup>3</sup>National Institute for Cellular Biotechnology & School of Health and Human Performance, Dublin City University, Dublin D09 NR58, Ireland; <sup>4</sup>Carmen INSERM U1060, University of Lyon, INRA U1235, Lyon 69500, France; <sup>5</sup>Human Nutrition Research Centre of Rhône-Alpes, Hospices Civils de Lyon, Lyon 69921, France; <sup>6</sup>Université de Montpellier, INRA, UMR 866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, Montpellier 34060, France; <sup>7</sup>Oxford Centre for Diabetes, Endocrinology and Metabolism, University of Oxford, Oxford OX3 7LE, United Kingdom; <sup>8</sup>Institute of Nutritional and Food Sciences, Human Nutrition, University of Bonn, 53115 Bonn, Germany; <sup>9</sup>German Aerospace Center (DLR), Institute of Aerospace Medicine, 51147 Cologne, Germany; <sup>10</sup>University of Duisburg-Essen, Department of Child and Adolescent Psychiatry, 45147 Essen, Germany; <sup>11</sup>Centre National d’Etudes Spatiales, Paris 75039, France; <sup>12</sup>Anschutz Health and Wellness Center, Anschutz Medical Campus, Aurora, Colorado 80045; and <sup>13</sup>Division of Endocrinology, Metabolism and Diabetes, University of Colorado, Anschutz Medical Campus, Aurora, Colorado 80045

**Context:** The effects of energy-balanced bed rest on metabolic flexibility have not been thoroughly examined.

**Objective:** We investigated the effects of 21 days of bed rest, with and without whey protein supplementation, on metabolic flexibility while maintaining energy balance. We hypothesized that protein supplementation mitigates metabolic inflexibility by preventing muscle atrophy.

**Design and Setting:** Randomized crossover longitudinal study conducted at the German Aerospace Center, Cologne, Germany.

**Participants and Interventions:** Ten healthy men were randomly assigned to dietary counter-measure or isocaloric control diet during a 21-day bed rest.

**Outcome Measures:** Before and at the end of the bed rest, metabolic flexibility was assessed during a meal test. Secondary outcomes were glucose tolerance by oral glucose tolerance test, body composition by dual energy X-ray absorptiometry, ectopic fat storage by magnetic resonance imaging, and inflammation and oxidative stress markers.

**Results:** Bed rest decreased the ability to switch from fat to carbohydrate oxidation when transitioning from fasted to fed states (*i.e.*, metabolic inflexibility), antioxidant capacity, fat-free mass

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in USA

Copyright © 2018 Endocrine Society

Received 14 October 2017. Accepted 7 March 2018.

First Published Online 12 March 2018

\*These authors contributed equally to the work.

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; AUC, area under the curve; BM, body mass; CM-TG, chylomicron-triglyceride; CRP, C-reactive protein; FFM, fat-free mass; FM, fat mass; GGT, gamma-glutamyl transpeptidase; HDL, high-density lipoprotein; KRL, Kit Radicaux Libres; LDL, low-density lipoprotein; MF, metabolic flexibility; mRNA, messenger RNA; NEFA, nonesterified fatty acid; NPRQ, nonprotein respiratory quotient; OGTT, oral glucose tolerance test; QUICKI, quantitative insulin-sensitivity check index; RMR, resting metabolic rate; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction; SEM, standard error of the mean; TEI, total energy intake.

(FFM), and muscle insulin sensitivity along with greater fat deposition in muscle ( $P < 0.05$  for all). Changes in fasting insulin and inflammation were not observed. However, glucose tolerance was reduced during acute overfeeding. Protein supplementation did not prevent FFM loss and metabolic alterations.

**Conclusions:** Physical inactivity triggers metabolic inflexibility, even when energy balance is maintained. Although reduced insulin sensitivity and increased fat deposition were observed at the muscle level, systemic glucose intolerance was detected only in response to a moderately high-fat meal. This finding supports the role of physical inactivity in metabolic inflexibility and suggests that metabolic inflexibility precedes systemic glucose intolerance. (*J Clin Endocrinol Metab* 103: 1910–1920, 2018)

Physical inactivity is responsible for 6% to 10% of major noncommunicable diseases and the second leading cause of death in the United States (1). Many epidemiological studies have provided convincing but indirect evidence of associations between daily low-level physical activity with glucose intolerance or insulin resistance and changes in the ratio of fat mass (FM) to fat-free mass (FFM). Though growing in number, data from interventional inactive studies remain scarce, and underlying mechanisms remain to be fully delineated.

Metabolic diseases share some common underlying mechanisms, such as insulin resistance, systemic inflammation, and oxidative stress (2). More recently, metabolic inflexibility, or the inability of the body to adjust nutrient oxidation to changes in nutrient availability (3), has been recognized as a core component of metabolic diseases (4–7). By reviewing data obtained during physical activity or exercise studies and bed-rest studies, we developed a theoretical construct that metabolic inflexibility is triggered by decreased physical activity (8, 9). This theory is supported by a subsequent retrospective analysis of longitudinal intervention studies manipulating the level of physical activity in both lean and overweight adults, suggesting that habitual physical activity predicts metabolic flexibility (MF) (10). However, in most of these studies energy balance changed to some extent. Whether metabolic inflexibility is induced by physical inactivity *per se* or by the associated positive energy balance (*i.e.*, increases in FM and loss of FFM) remains to be answered.

In that respect, although FM can be controlled by diet, FFM changes that occur during sedentary behavior are more complex. The observed loss in FFM plays a confounding role on metabolic regulation, a common feature of type 2 diabetes, obesity, and sarcopenia. Exercise, vibration, and amino acid supplementation, alone or combined, have been used to mitigate these changes during bed rest, but to date none has fully prevented the adverse effects. Whey protein has been shown to stimulate protein synthesis during bed rest (11, 12) and prevent hyperinsulinemia (13), the increase in plasma lipids (14), and ectopic storage in the liver (15). It also

improves insulin sensitivity in older ambulatory adults (16). It is not known whether supplementation with whey protein during bed rest could offset the decrement in MF proposed in our theoretical construct.

The purpose of this study was to prospectively determine whether physical inactivity, independent of detectable changes in energy balance, triggers metabolic inflexibility in healthy individuals and whether metabolic inflexibility precedes or follows the whole-body glucose intolerance systematically reported during bed rest. We hypothesized that after 21 days of bed rest there would be a smaller variance in substrate oxidation after an oral glucose tolerance test (OGTT) and a challenge test meal, indicative of decreased MF. We also hypothesized that the development of glucose intolerance along with metabolic inflexibility could be prevented with whey protein supplementation through preservation of FFM.

## Material and Methods

### Participants

Ten healthy, active men with a body mass index between 20 and 25 kg/m<sup>2</sup> participated in a 21-day bed-rest study (Table 1). Participants were free of any history of diabetes mellitus, hyperlipidemia, hyperglycemia, hyperthyroidism, or hypothyroidism and were nonsmokers, with no excessive alcohol or drug consumption. One participant completed the control treatment but dropped out before the protein treatment; results are presented for nine participants. The study was approved by the ethics commission of the Ärztekammer Nordrhein (Düsseldorf, Germany) and conducted in accordance with ethical principles of the Declaration of Helsinki.

### Study design

As detailed previously (17), the experimental protocol was a random crossover design where the participants completed 21 days in the control and protein supplementation conditions, separated by a minimum 4-month washout. During bed-rest periods participants remained in a supine position. In the protein treatment, participants received whey protein (0.6 g/kg body weight per day) supplementation, with potassium bicarbonate (90 mmol/d KHCO<sub>3</sub>) to offset the acidic effect of the whey protein (18). Participants resided at the facility for 7 days before and 5 days after each bed-rest period; bed resting was forbidden during the daytime, and walking was encouraged

**Table 1. Anthropometry and Metabolic Variables, Inflammation, and Oxidative Stress Markers**

| Characteristics                          | Control (n = 9) |                | Protein (n = 9) |                 | Statistics       |            |               |
|--|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------|---------------|
|  | Baseline        | Bed Rest       | Baseline        | Bed Rest        | BR Effect        | Trt Effect | BR*Trt Effect |
| Age, y                                   | 31.0 ± 2.1      |                | 31.0 ± 2.1      |                 |                  |            |               |
| Height, m                                | 1.80 ± 0.02     |                | 1.80 ± 0.02     |                 |                  |            |               |
| BMI, kg/m <sup>2</sup>                   | 23.8 ± 0.5      | 23.6 ± 0.5     | 23.9 ± 0.5      | 23.6 ± 0.5      | <b>0.02</b>      | 0.81       | 0.97          |
| BM and body composition                  |                 |                |                 |                 |                  |            |               |
| BM, kg                                   | 77.2 ± 1.9      | 76.3 ± 1.9     | 77.3 ± 1.6      | 76.4 ± 1.5      | <b>0.02</b>      | 0.91       | 0.97          |
| FM, kg                                   | 18.6 ± 1.3      | 18.0 ± 1.1     | 17.7 ± 1.1      | 18.1 ± 1.1      | 0.72             | 0.61       | 0.56          |
| % FM                                     | 23.8 ± 1.1      | 23.5 ± 1.0     | 22.9 ± 1.0      | 23.5 ± 1.0      | 0.49             | 0.38       | 0.47          |
| FFM, kg                                  | 59.0 ± 1.3      | 58.4 ± 1.1     | 59.0 ± 1.0      | 58.5 ± 0.8      | <b>0.03</b>      | 0.34       | 0.55          |
| Leg lean BM, kg                          | 19.5 ± 0.6      | 18.9 ± 0.5     | 19.3 ± 0.5      | 18.8 ± 0.4      | <b>&lt;0.001</b> | 0.91       | 0.60          |
| Liver fat content, %                     | 3.2 ± 0.2       | 2.8 ± 0.2      | 2.9 ± 0.2       | 2.9 ± 0.2       | <b>&lt;0.01</b>  | 0.52       | 0.07          |
| Calf fat content, %                      | 4.5 ± 0.1       | 4.8 ± 0.2      | 4.6 ± 0.2       | 4.8 ± 0.2       | <b>0.04</b>      | 0.80       | 0.59          |
| Subcutaneous adipose tissue, pixels      | 8573.7 ± 980.3  | 8049.1 ± 841.7 | 8887.0 ± 1057.5 | 7646.0 ± 1021.0 | <b>0.01</b>      | 0.41       | 0.34          |
| Visceral adipose tissue, pixels          | 3878.0 ± 548.6  | 3538.4 ± 543.2 | 3254.7 ± 443.7  | 3477.6 ± 381.7  | 0.24             | 0.54       | 0.76          |
| Plasma fasting metabolic variables       |                 |                |                 |                 |                  |            |               |
| Glucose, g/L                             | 0.84 ± 0.02     | 0.84 ± 0.02    | 0.86 ± 0.03     | 0.87 ± 0.03     | 0.68             | 0.10       | 0.76          |
| Insulin, mIU/L                           | 6.01 ± 0.73     | 6.09 ± 0.43    | 4.88 ± 0.49     | 5.55 ± 0.62     | 0.43             | 0.08       | 0.53          |
| QUICKI                                   | 1.56 ± 0.13     | 1.75 ± 0.16    | 1.46 ± 0.07     | 1.56 ± 0.09     | 0.15             | 0.14       | 0.65          |
| Total glucose, mmol/L                    | 0.77 ± 0.08     | 0.81 ± 0.05    | 0.81 ± 0.08     | 0.77 ± 0.09     | 0.87             | 1.00       | 0.20          |
| NEFA, mmol/L                             | 0.33 ± 0.04     | 0.37 ± 0.05    | 0.33 ± 0.04     | 0.39 ± 0.04     | 0.07             | 0.46       | 0.83          |
| LDL/HDL cholesterol, %                   | 0.145 ± 0.015   | 0.151 ± 0.016  | 0.148 ± 0.014   | 0.165 ± 0.009   | 0.19             | 0.28       | 0.52          |
| Leptin, ng/mL                            | 8.92 ± 4.14     | 4.57 ± 0.90    | 7.55 ± 2.69     | 7.30 ± 3.06     | 0.19             | 0.71       | 0.24          |
| Total adiponectin, μg/mL                 | 5.03 ± 0.39     | 3.25 ± 0.31    | 5.07 ± 0.54     | 3.28 ± 0.43     | <b>&lt;0.001</b> | 0.83       | 0.99          |
| High-molecular-weight adiponectin, μg/mL | 2.87 ± 0.27     | 1.88 ± 0.18    | 2.80 ± 0.26     | 1.94 ± 0.26     | <b>&lt;0.001</b> | 0.98       | 0.60          |
| Plasma inflammation markers              |                 |                |                 |                 |                  |            |               |
| ALT, IU/L                                | 14.13 ± 1.25    | 15.79 ± 1.13   | 15.53 ± 1.74    | 19.57 ± 2.41    | 0.06             | 0.12       | 0.41          |
| AST, (IU/L)                              | 19.23 ± 1.90    | 17.33 ± 1.27   | 19.83 ± 1.57    | 18.28 ± 1.46    | <b>0.04</b>      | 0.39       | 0.83          |
| GGT, IU/L                                | 18.83 ± 2.94    | 18.29 ± 2.86   | 17.00 ± 2.34    | 17.69 ± 2.37    | 0.95             | 0.17       | 0.58          |
| CRP, mg/dL                               | 0.053 ± 0.014   | 0.054 ± 0.013  | 0.046 ± 0.011   | 0.043 ± 0.013   | 0.65             | 0.40       | 0.94          |
| Plasma oxidative stress markers          |                 |                |                 |                 |                  |            |               |
| KRL, mmol of Trolox/L of plasma          | 4.97 ± 0.20     | 4.71 ± 0.18    | 5.04 ± 0.18     | 4.53 ± 0.11     | <b>0.04</b>      | 0.70       | 0.49          |

Data are means ± standard error of the mean. Significant *P* values < 0.05 are indicated in bold.

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BM, body mass; BMI, body mass index; BR, bed rest; CRP, C-reactive protein; GGT, gamma-glutamyl transpeptidase; HDL, high-density lipoprotein; KRL, Kit Radicaux Libres; LDL, low-density lipoprotein; NEFA, nonesterified fatty acid; QUICKI, quantitative insulin-sensitivity check index; Trt, treatment.

during these periods. Because the primary purpose was to address questions related to space science, the participants were at a  $-6^\circ$  head-down tilt position for the duration of bed rest to mimic the vascular changes associated with microgravity (19). Before and at the end of the bed rest, glucose tolerance was assessed with an OGTT, MF was assessed in response to a standardized challenge test meal, the skeletal muscle insulin-signaling pathway was examined, skeletal muscle and liver fat content were measured by magnetic resonance imaging, and key plasma markers of inflammation and oxidative stress were measured (Supplemental Fig. 1). Detailed material and methods can be found in the Supplemental Materials and Methods.

### Diet and energy balance

Diet was tightly controlled during the study by registered dietitians. Energy intake was 1.6 resting metabolic rate (RMR) in the baseline and recovery periods and 1.2 RMR during bed

rest. RMR was measured by indirect calorimetry for 30 minutes after 30 minutes of rest. Based on the European Space Agency standardization plan, total energy intake (TEI) consisted of 56% carbohydrates, 30% lipids, and 14% protein intake (1.2 g/kg body weight/d) during baseline and recovery. Percentage of saturated fat intake was kept at 10% of total fat intake. During bed rest, protein intake was increased to 19% TEI, with an associated isocaloric reduction in carbohydrate intake to 51% TEI in the control condition, whereas protein intake was increased to 28% (1.2 g + supplementation of 0.6 g/kg body weight/d) along with an isocaloric decrease in lipid intake to 25% TEI in the protein condition. Detailed nutritional data were previously published (17).

### Body mass and composition

Body mass (BM) was measured with an electronic scale after an overnight fast. FM and FFM were measured with a



dual-energy X-ray absorptiometry scan. Liver and calf fat content were measured by magnetic resonance imaging (see Supplemental Materials and Methods).

### Glucose tolerance and insulin sensitivity

Glucose tolerance was assessed during a 75-g OGTT including 2.5 g of d<sub>7</sub>-glucose mixed in 300 mL of glucose solution (0.25 g/L) to measure exogenous glucose oxidation. Blood draws were collected every 30 minutes for 2 hours for glucose and insulin concentrations. The oxidation rate of exogenous glucose was inferred from the cumulative recovery of <sup>2</sup>H in water contained in blood samples, as previously described (20). A muscle insulin sensitivity index was estimated as the ratio between the rate of disappearance of glucose from the maximal glucose concentration and the average insulin concentration over the same period of time (21). The percentage of nonesterified fatty acid (NEFA) suppression divided by the total amount of insulin over the test period was used as an index of adipose tissue lipolysis.

### MF

MF was assessed during a moderately high-fat, high-energy test meal (4 MJ or 52% RMR, 44% carbohydrate, 41% lipid, 15% protein). The meal consisted of a liquid meal mixed with colza and olive oil and 2.2 g d<sub>31</sub>-tripalmitic acid (99% enrichment) added to bread, butter, and raspberry jam. d<sub>31</sub>-Tripalmitic acid was used to assess changes in gastric emptying. Blood, breath, and urine samples were collected at baseline and every hour for 7 hours. Gas exchange by indirect calorimetry was performed for 30 minutes every hour and, with urinary nitrogen excretion, was used to measure nonprotein respiratory quotient (NPRQ) and total carbohydrate oxidation (22). Between 9 and 11 hours after the test meal and 2 hours after a snack (salad, 200 g bread, and a cereal bar), soleus muscle biopsies were collected. MF was assessed with different indices, as explained previously (8). In brief, we calculated the range of NPRQ and insulin over 7 hours and then calculated the mathematical variances of these parameters by using the seven postprandial time points and the fasting values. Data are presented as mean insulin variance as a function of mean NPRQ variance. Area under the curve (AUC) was calculated over 7 hours (AUC<sub>7H</sub>), over the first 3 hours (AUC<sub>0-3H</sub>), and over the last 4 hours (AUC<sub>3-7H</sub>) for plasma insulin, glucose, triglycerides, NEFA, incorporation of d<sub>31</sub>-tripalmitic acid in chylomicron triglyceride (CM-TG), and total glucose oxidation. These time periods were based on the triglyceride kinetics because the test meal was moderately high in lipids.

### Gastric emptying

The incorporation of d<sub>31</sub>-tripalmitic acid in CM-TG was used to determine changes in gastric emptying potentially induced by the head-down tilt position. The incorporation involved lipoprotein separation by ultracentrifugation, extraction of lipids, separation of triglycerides, and derivation for gas chromatography–mass spectrometry measurements of both unlabeled and labeled palmitate concentration, as previously described (23).

### Plasma metabolites, insulin, and inflammatory and oxidative stress markers

Plasma glucose total triglycerides, CM-TG, and NEFA concentrations were measured with colorimetric assays, whereas insulin was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay.

The ratio between low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol was measured with lipoprotein electrophoresis. Specific hepatic inflammation markers [*i.e.* alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), C-reactive protein (CRP), and fibrinogen] were measured with standard techniques. Antioxidant capacity was evaluated by using the Kit Radicaux Libres (KRL) and Reserves Défenses Antioxydantes tests as previously described (24).

### Gene expression

Gene expression was quantified with microfluidic real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) for key proteins involved in the insulin signaling pathway, glucose uptake, and glycogen synthesis (IRS1, PIK3R1, PKB, GSK3B, PRKCA, GLUT4, MAP2K1, MAPK1), as previously described (25). Additional details are provided in Supplemental Materials and Methods.

### Statistical analysis

Data are presented as means or AUC ± standard error of the mean (SEM). Analyses were performed with SAS software, with significance set at 0.05. After having tested the absence of carryover effect, we analyzed the data with a linear mixed effects model controlling for repeated measures over bed rest and along periods when appropriate, with period, bed rest, treatment, and bed-rest × treatment interactions as fixed effects and a compound symmetry within-subject variable. There was no statistical difference at baseline.

Associations between variable changes over bed rest were tested with a linear mixed effects model controlling for repeated measures along periods, with R<sup>2</sup> being calculated with a likelihood test.

## Results

### Body composition and organ fat content

Bed rest significantly decreased BM through a significant decrease in FFM, particularly leg lean BM (Table 1). FM and the percentage of FM remained stable, indicating the maintenance of energy balance. However, a change in fat deposition was observed; whereas the percentage fat content decreased in liver, it increased in the calf. Similarly, intra-abdominal fat content did not change, whereas subcutaneous fat dropped. No treatment or interaction effects were noted. This finding suggests that muscle ectopic fat storage occurs even in energy-balanced conditions.

### Cardiometabolic, inflammatory, and oxidative stress markers

No change was observed in fasting plasma triglycerides, leptin, NEFA, and LDL/HDL cholesterol ratio (Table 1).

GGT and CRP remained unchanged during bed rest. Although the ALT/AST ratio significantly increased, the ratio was far below the threshold of 2.0 commonly used to indicate clinical nonalcoholic fatty liver. KRL

significantly decreased after bed rest, indicating a lower global antioxidant capacity. Altogether these data suggest that although systemic inflammation is not apparent, an onset may have been triggered despite a decrease in hepatic fat content.

### Glucose tolerance and insulin sensitivity

Neither fasting plasma glucose and insulin nor the quantitative insulin-sensitivity check index (QUICKI) were modified by bed rest, and no differences were noted between the two treatments (Table 1). Similarly, the 2-hour AUCs for glucose, insulin, and exogenous glucose oxidation were similar before and after bed rest (Fig. 1), indicating no significant change in whole-body glucose tolerance. The liver insulin sensitivity index (data not shown) was not decreased by bed rest. However, the decrease in both total and high-molecular-weight adiponectin (Table 1) along with the significant reduction in the muscle insulin sensitivity index suggests reduced insulin sensitivity regardless of the diet provided. No association with the changes in FM was noted. By combining data from the two conditions, we observed a positive association between bed-rest-induced changes in FFM and muscle insulin sensitivity index ( $R^2 = 0.60$ ;  $P < 0.001$ ) (Fig. 1).

### Metabolic responses to the challenge test meal

After the test meal, postprandial insulin AUC<sub>7H</sub> was not affected by bed rest (Fig. 2). However, postprandial glucose concentration significantly rose, whereas total carbohydrate oxidation dropped. There was no bed-rest  $\times$  treatment interaction for carbohydrate oxidation, with postprandial glucose AUC<sub>7H</sub> increasing three times more in the protein than in the control treatment ( $P < 0.02$ ), suggesting a lower glucose uptake, a greater competition between substrates with whey protein supplementation, or an increase in *de novo* gluconeogenesis from amino acids for oxidation.

Interestingly, the decrease in total carbohydrate oxidation adjusted for FFM occurred during the first 3 hours of the test only and was followed by an increase in postprandial glucose in the next 4 hours, suggesting that lower peripheral glucose uptake contributed to higher glycemia in inactive conditions. This greater glycemia over the last 4 hours of the test was concomitant with an increase in insulin AUC<sub>3–7H</sub>, suggesting the development of glucose intolerance had begun but was detectable only in late postprandial conditions when stimulated by a fat meal.

Bed rest did not change the time course of postprandial triglyceride AUC<sub>7H</sub> but led to a significant reduction in total NEFA AUC<sub>7H</sub> in both treatments (Fig. 3). In fact, postprandial NEFA AUC<sub>0–3H</sub> significantly increased, with the increase tending to be higher in the protein

treatment (interaction = 0.08), whereas the NEFA AUC<sub>3–7H</sub> significantly decreased in both conditions. These changes cannot be attributed to modifications in time taken for food to enter the small intestine, given that the rate of appearance of d<sub>31</sub>-tripalmitic acid in CM-TG, a marker of gastric emptying, was not changed. Rather, they may be caused by the higher insulin concentration maintaining adipose tissue lipolysis inhibited or by a greater use of fat as fuel.

Independent of the condition, both peak to nadir values and NPRQ variances significantly decreased (Fig. 4), and insulin variance remained unchanged. This finding indicates that the lower shift from fat to carbohydrate oxidation from fasting to fed states was related mainly to metabolic disruptions at the muscle level. The percentage of NEFA suppression after meal ingestion was calculated between 0 and 60 minutes and normalized for insulin AUC<sub>7H</sub>. The values significantly decreased after bed rest in both conditions, suggesting a weaker response of adipose tissue to the effects of insulin.

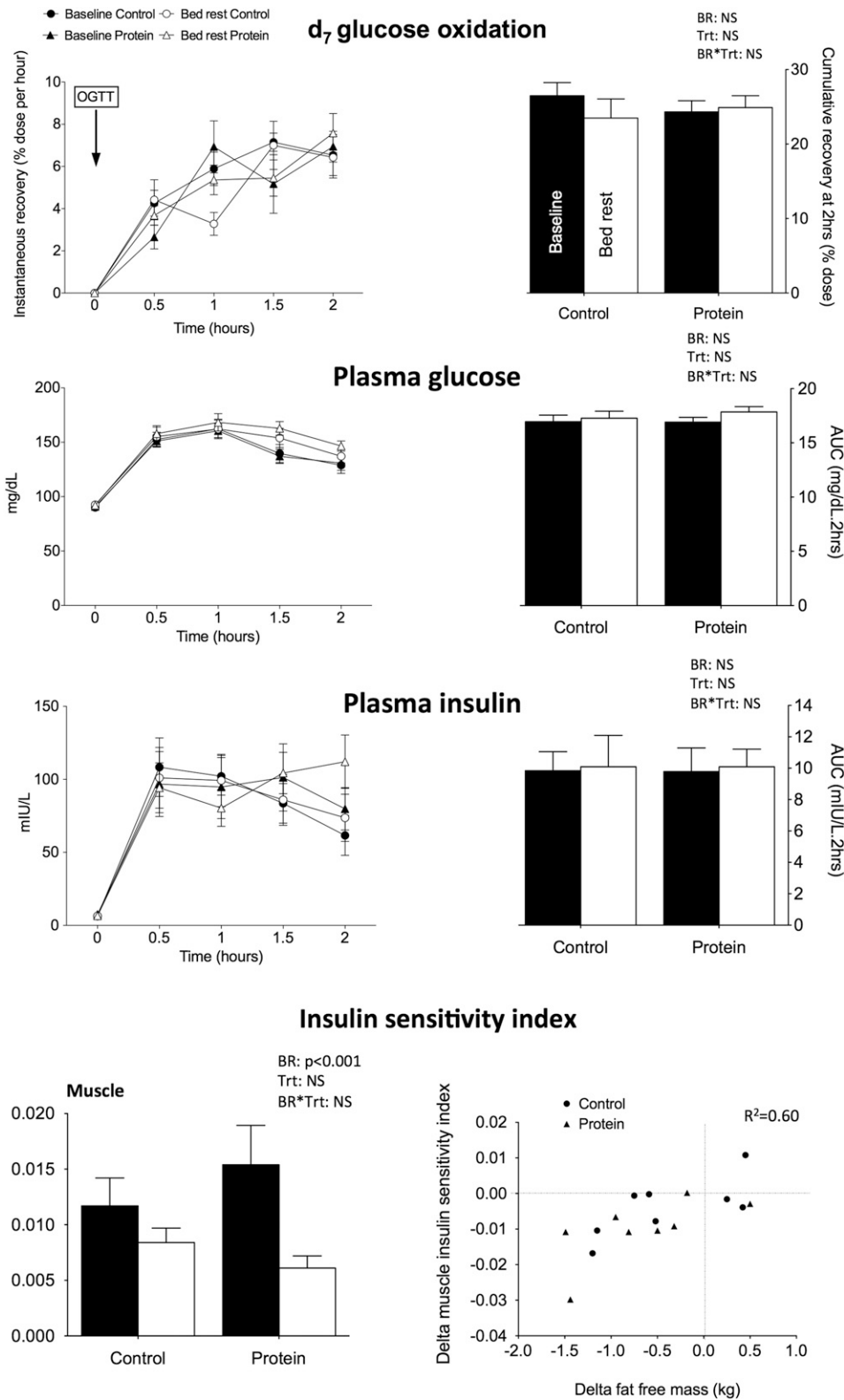
### Skeletal muscle insulin signaling pathway

Changes in gene expression of the key proteins were measured from skeletal muscle biopsies collected 2 hours after a snack (Table 2). In both conditions, IRS1 messenger RNA (mRNA) levels tended to decrease, whereas PIK3R2 mRNA levels tended to increase. Gene expression of all the other targeted proteins remained unchanged.

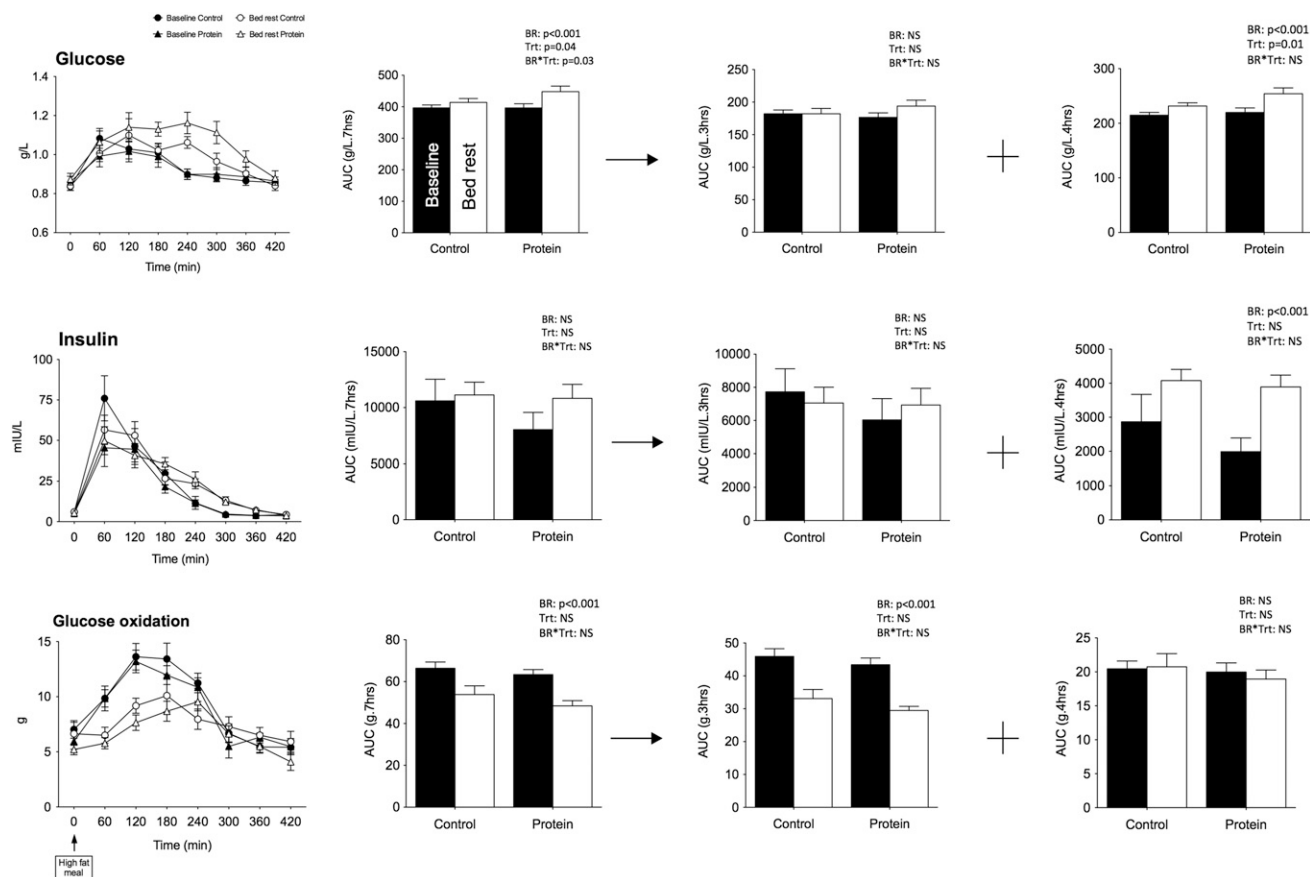
### Discussion

We have shown that, in lean healthy men, physical inactivity triggers metabolic inflexibility, even when energy balance is maintained. Although a decreased insulin sensitivity index and increased fat deposition were observed at muscle level, systemic glucose intolerance was detected only in response to a moderately high-fat, high-energy standard meal. This finding supports our hypothesis that physical inactivity and sedentary behaviors are determinants of metabolic inflexibility (8, 9) and that metabolic inflexibility probably precedes the development of glucose intolerance when energy balance is maintained. This finding also suggests that subtle changes in glucose intolerance may not be apparent when energy balance is maintained unless challenged with acute overfeeding, but metabolic inflexibility may be an effective early indicator of metabolic abnormalities. Metabolic inflexibility could be a biomarker for glucose intolerance and increased risk of metabolic disease that could be used in preventive strategies.

In a review of MF and insulin resistance, Galgani *et al.* (26) suggested that a number of additional metabolic challenges, besides the clamp, should be considered in the



**Figure 1.** Glucose tolerance after OGTT. Mean kinetics of d<sub>7</sub> glucose oxidation and plasma insulin and glucose of the 9 participants are presented for control and protein treatment at baseline and after 21 days of bed rest after an OGTT at 75 mg. AUCs are presented on the right side of the figure. OGTT-derived muscle insulin sensitivity index derived from plasma insulin and glucose is presented as calculated from Abdul-Ghani *et al.* (21) at the right bottom of the figure. Data are means ± SEM. Statistical analyses were performed with a linear mixed effects model adjusted for period effect and controlled for repeated measures. Results are presented as *P* values for bed rest (BR), treatment (Trt), and BR\*Trt effects. *P* < 0.05 is considered significant. The relationship between delta insulin sensitivity index and delta FFM is presented at the left bottom of the figure. NS, nonsignificant.

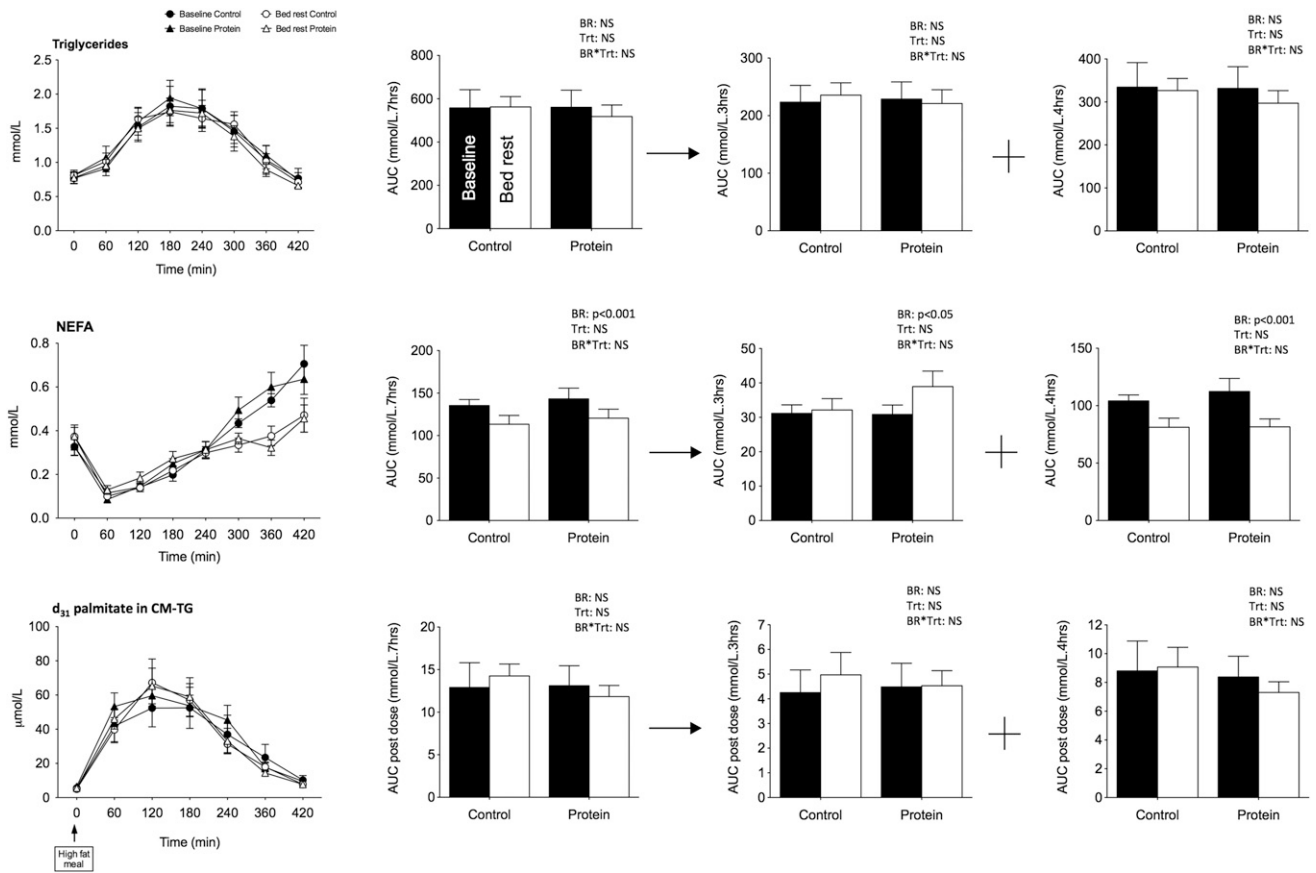


**Figure 2.** Plasma glucose, insulin, and glucose oxidation after lipid challenge. Mean kinetics of plasma glucose, insulin, and glucose oxidation and corresponding AUCs after a standardized fat meal (40% fat intake as energy) of the 9 participants are presented for the control and protein treatments at baseline and after bed rest. AUCs are presented over the 7-hour test and also for the first 3 hours and the last 4 hours of the test. Data are means ± SEM. Statistical analyses were performed with a linear mixed effects model adjusted for period effect and controlling for repeated measures. Results are presented as *P* values for bed rest (BR), treatment (Trt), and BR\*Trt effects. *P* < 0.05 is considered significant. The relationship between delta insulin sensitivity index and delta FFM is presented at the left bottom of the figure. NS, nonsignificant.

assessment of MF. For example, the fuel shifts in response to dietary challenges varying in macronutrient composition could be considered. We recently extended their statement by ascribing to the view that any paradigm that aims to assess MF must have three components: stressor, regulator, and effector (9). It is the allostatic relationship between the regulator and effector in response to the stressor that is measured experimentally and informs on MF. In this study, the stressor was the moderately high-fat, high-energy test meal, the regulator was insulin, and the effector was NPRQ. By using this approach, we demonstrated that physical inactivity leads to metabolic inflexibility. These data support our previous work suggesting that habitual physical activity predicts MF (10). Because metabolic inflexibility is increasingly recognized as one of the causes of obesity and related metabolic diseases (9), our findings support the key role of physical inactivity and sedentary behaviors in weight gain.

The absence of clear evidence of whole-body glucose intolerance and insulin resistance was surprising. Insulin resistance has been repeatedly observed during bed-rest

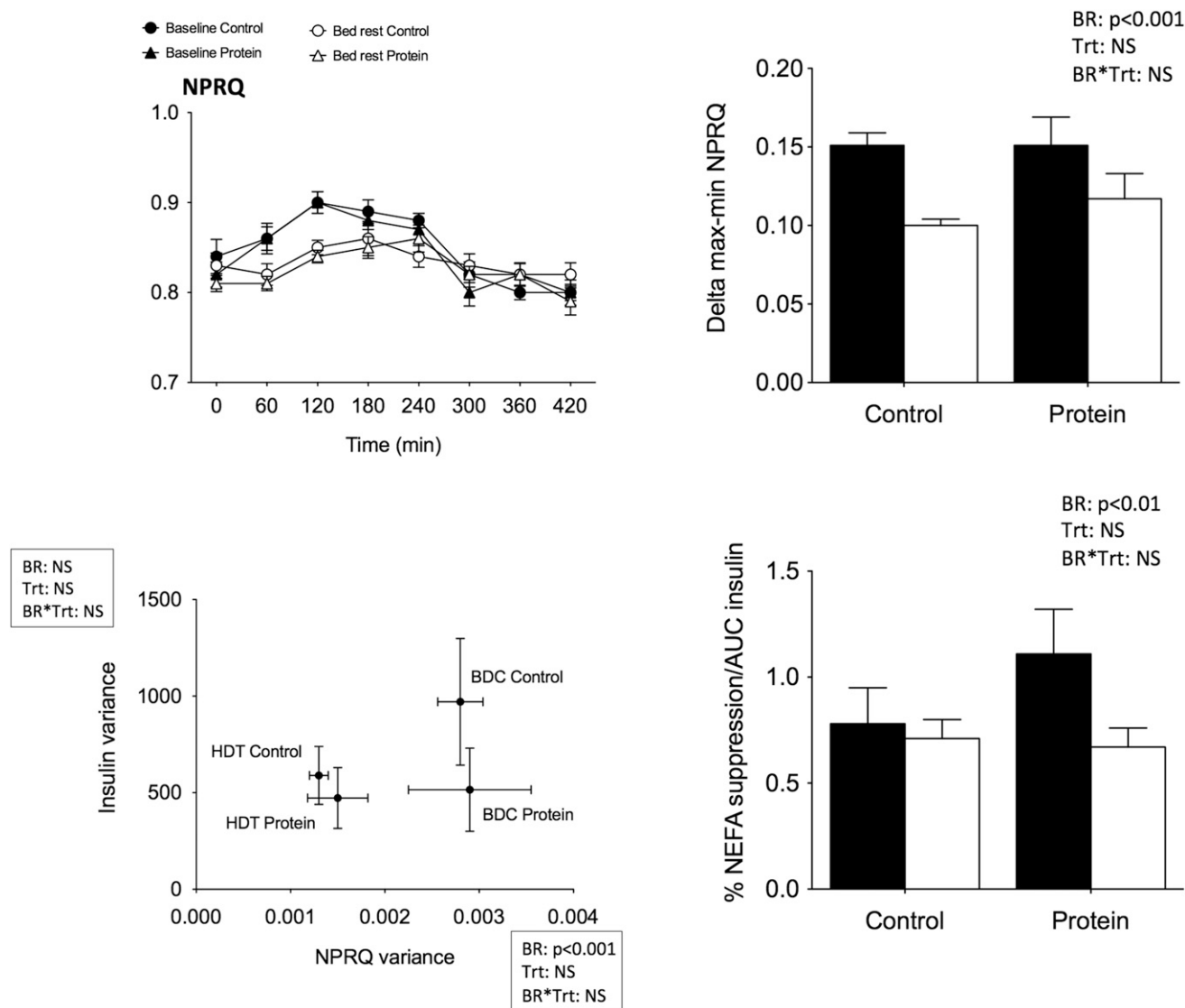
studies regardless of sex (23, 27–29), age (8), duration (27, 28), and phenotype (30, 31). It has been detected with a number of indices and methods to assess insulin sensitivity or glucose tolerance, including insulin/glucose ratio, homeostatic model assessment, and QUICKI, during an OGTT, intravenous glucose tolerance test, or hyperinsulinemic euglycemic clamp or in response to standardized meals (see review in 8). Given the observed positive association between the muscle index of insulin resistance and FFM, the modest loss of FFM in this bed rest may partly explain the discrepancy. Our participants lost on average half a kilo of FFM. By comparison, healthy men had lost 2.9 kg after 21 days (32) or 2.4 kg after 3 months of bed rest (28) in energy balance conditions. Modest decreases in FFM after only 7 days of bed rest were shown to lead to insulin resistance, but participants were in marked positive energy balance, as indicated by high levels of plasma leptin (33). In stable energy balance and in the absence of FM gain, metabolic disruption induced by bed rest (and physical inactivity) may be blunted.



**Figure 3.** Plasma triglycerides, nonesterified fatty acids, and  $d_{31}$  palmitate enrichment in chylomicrons after lipid challenge. Mean kinetics of plasma triglycerides and NEFA and  $d_{31}$  palmitate enrichment in chylomicrons observed after a standardized fat meal (40% fat intake as energy) in the 9 participants in control and protein treatments at baseline and after bed rest. AUCs are presented over 7 hours after the meal and for the first 3 hours and the last 4 hours after the meal. Data are means  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed with a linear mixed effects model adjusted for period effect and controlled for repeated measures. Results are presented as  $P$  values for bed rest (BR), treatment (Trt), and BR\*Trt effects.  $P < 0.05$  is considered significant. NS, nonsignificant.

Although the complex pathogenesis of glucose intolerance and insulin resistance is not fully understood, data accumulated in recent decades indicate that underlying mechanisms include systemic inflammation, oxidative stress, ectopic lipid deposition, intramuscular accumulation of lipid intermediates, vascular changes, and reduced mitochondrial content or oxidative capacity. Here, the antioxidative stress capacities of the body were altered, and the increase in ALT, known to be specific of liver damage, may represent an onset of liver metabolic dysfunction (34) despite a decrease in hepatic fat content and levels still in the normal range. The decrease in both total and high-molecular-weight adiponectin, known to play a role in regulating insulin sensitivity, despite constant whole-body FM supports a reduction in insulin sensitivity (35), even though we did not use the gold standard clamp technique. We also observed an impaired capacity to shift from fat oxidation in the fasting state to carbohydrate oxidation in the fed state, associated with a greater postprandial insulin concentration in response to a standard test meal, increased fat deposition in leg muscles, increased muscle insulin sensitivity index, and a

minor alteration in the insulin-signaling pathway, as indicated by the slightly reduced muscle IRS1 mRNA. A recent report showed that 7 days of bed rest induced insulin resistance but did not lead to increased skeletal muscle lipid content (36). The repartitioning of fat we observed with an increase in muscle fat deposition suggests that muscle lipid accumulation probably takes  $>7$  days, but direct measurements of muscle lipids are needed to confirm this assumption. Previous studies showed that bed rest induces a lower glucose disposal rate along with a decrease in glucose-mediated insulin pathway proteins GLUT4, hexokinase 2, or glycogen synthase at the muscle level (37) but also altered fatty acid transport into muscle and fat oxidation (23, 28). A recent report indicated that 20 days of bed rest reduced insulin sensitivity in association with altered muscle mitochondrial respiration (32). During overfeeding, these physical inactivity-induced metabolic adaptations, (*i.e.*, lower glucose and fatty acid uptake along with altered mitochondrial function) are probably the cause of the observed inability of adjusting nutrient oxidation to change in nutrient availability (*i.e.*, metabolic inflexibility).



**Figure 4.** MF after lipid challenge. Upper left: Mean NPRQ kinetics over the 7 hours after ingestion of fat meal. Upper right: Mean delta max-min of NPRQ values. Lower left: Mean insulin variance values as a function of mean NPRQ variance calculated over the 7 hours after the meal. Lower right: Percentage NEFA suppression normalized by AUC insulin. Each graph represents the values from the 9 participants in the control and protein treatments at baseline (black) and after bed rest (white). Data are means ± SEM. Statistical analyses were performed with a linear mixed effects model adjusted for period effect and controlling for repeated measures. Results are presented as *P* values for bed rest (BR), treatment (Trt), and BR\*Trt effects. *P* < 0.05 is considered significant. BDC, baseline data collection; HDT, head-down tilt bed rest; NS, nonsignificant.

Altogether these results support an ongoing development of glucose intolerance, caused by simultaneous metabolic dysfunctions, that are not detected during stable energy balance but unmasked when during acute positive energy balance.

When a person is inactive, adequate diet composition is even more critical. Because glucose uptake is impaired and oxidative capacity is compromised, maintaining low carbohydrate and fat intake in favor of high protein intake is probably preferable. In this study, we tested the effect of whey protein supplementation, because it has shown positive impact on lipid and glucose metabolism, insulin sensitivity, and muscle atrophy (13, 38). Overall we observed no significant effect of the whey protein

supplementation on gene expression of the key protein involved in insulin-signaling pathways, suggesting no effect on the protein anabolism pathway. Another team similarly reported no positive effect of whey protein supplementation on key proteolysis markers in the same participants (39). Overall, whey protein supplementation did not prevent adverse metabolic adaptations to bed rest. On the contrary, postprandial glycemia was even greater with protein supplementation compared with the control condition. As shown recently, this adverse effect may be explained by the decrease in insulin-mediated glucose disposal induced by whey protein supplementation (40). Based on these data, whey protein supplementation does not seem to be a good countermeasure to bed rest.

**Table 2. Microfluidic RT-PCR and Western Blot Analyses in Soleus Muscle**

|        | Microfluidic RT-PCR Analyses (Relative mRNA Levels: Fold Change/Baseline) |                 | Statistics  |            |               |
|--------|---|-----------------|-------------|------------|---------------|
|        | Control (n = 8)   | Protein (n = 9) | BR Effect   | Trt Effect | BR*Trt Effect |
| IRS1   | 0.68 ± 0.09   | 0.95 ± 0.17     | <b>0.06</b> | 0.19       | 0.15          |
| PIK3R1 | 0.95 ± 0.11   | 1.12 ± 0.11     | 0.71        | 0.28       | 0.31          |
| PIK3R2 | 1.04 ± 0.15   | 1.24 ± 0.07     | 0.11        | 0.26       | 0.26          |
| PKB    | 0.96 ± 0.13   | 0.91 ± 0.06     | 0.31        | 0.79       | 0.70          |
| GSK3B  | 0.96 ± 0.08   | 1.01 ± 0.07     | 0.74        | 0.58       | 0.61          |
| PRKCA  | 1.08 ± 0.18   | 0.96 ± 0.09     | 0.84        | 0.74       | 0.53          |
| GLUT4  | 0.87 ± 0.15   | 0.89 ± 0.09     | 0.15        | 0.94       | 0.90          |
| MAP2K1 | 1.05 ± 0.15   | 0.96 ± 0.09     | 0.95        | 0.62       | 0.62          |
| MAPK1  | 1.02 ± 0.14   | 0.98 ± 0.07     | 0.96        | 0.96       | 0.81          |

Data are means ± SEM.

Abbreviations: GLUT4, glucose transporter type 4; GSK3B, glycogen synthase kinase 3 beta; IRS1, insulin receptor 1; MAP2K1, mitogen-activated protein kinase kinase 1; MAPK1, mitogen-activated protein kinase 1; PIK3R1, phosphoinositide-3 kinase regulatory subunit 1; PIK3R2, phosphoinositide-3 kinase regulatory subunit 2; PKB, protein kinase B; pPKB, phosphorylated protein kinase B; PRKCA, protein kinase C-alpha.

Limitations must be acknowledged. The volunteers' habitual daily fat intake was about 34% (17), whereas 30% of energy was provided as fat in the study. This lower-fat diet in addition to a stable energy balance may explain the decrease in liver fat content (41) and the absence of fasting whole-body glucose intolerance. Muscle biopsies were not performed under controlled insulin-stimulated conditions and were limited in both number and size. Finally, insulin sensitivity was not measured by the gold standard method of the euglycemic hyperinsulinemic clamp; because insulin resistance is a metabolic adaptation constantly observed during bed rest, this procedure did not seem necessary.

In conclusion, these data support the role of low levels of physical inactivity in metabolic inflexibility status, weight gain, glucose intolerance, and associated metabolic diseases. Under inactive conditions, metabolic alterations are minor as long as energy intake matches energy expenditure. However, when the body faces metabolic challenges with acute overfeeding, metabolic dysfunctions are unmasked. Because it has been clearly shown that free-living humans are unable to spontaneously decrease their energy intake low enough to match low levels of energy expenditure in free-living conditions (42), these findings feed the debate on the respective role of energy intake and physical activity in weight gain and associated metabolic diseases. Over a lifetime, sedentary people will experience a large number of overfeeding events during which the metabolic dysfunctions are fully at play, leading to weight gain.

## Acknowledgments

We thank all the volunteers and the staff at the German space agency (DLR) who participated to the success of this bed-rest study.

**Financial Support:** The bed-rest study was funded by the European Space Agency (ESA) and the German Aerospace

Center (DLR). The experiments outlined in this manuscript were supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique and from the European (ESA) and French (CNES) space agencies. F.R. and A.D. are supported by PhD fellowships from CNES.

**Clinical Trial Information:** ClinicalTrials.gov no. NCT01655979 (registered 31 July 2012).

**Correspondence and Reprint Requests:** Stéphane Blanc, PhD, IPHC-DEPE, Centre National de la Recherche Scientifique, 23 Rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France. E-mail: [stephane.blanc@iphc.cnrs.fr](mailto:stephane.blanc@iphc.cnrs.fr).

**Disclosure Summary:** The authors have nothing to disclose.

## References

1. The world health report 2002: reducing risk, promoting healthy life. 2002. Available at: <http://www.who.int/whr/2002/en>. Accessed 10 July 2009.
2. Gratas-Delamarche A, Derbré F, Vincent S, Cillard J. Physical inactivity, insulin resistance, and the oxidative-inflammatory loop. *Free Radic Res*. 2014;**48**(1):93–108.
3. Kelley DE, Mandarino LJ. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes*. 2000;**49**(5):677–683.
4. Astrup A. The relevance of increased fat oxidation for body-weight management: metabolic inflexibility in the predisposition to weight gain. *Obes Rev*. 2011;**12**(10):859–865.
5. Kelley DE, Goodpaster B, Wing RR, Simoneau JA. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol*. 1999;**277**(6 Pt 1):E1130–E1141.
6. Kelley DE, Simoneau JA. Impaired free fatty acid utilization by skeletal muscle in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1994;**94**(6):2349–2356.
7. Kelley DE, Mandarino LJ. Hyperglycemia normalizes insulin-stimulated skeletal muscle glucose oxidation and storage in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1990;**86**(6):1999–2007.
8. Bergouignan A, Rudwill F, Simon C, Blanc S. Physical inactivity as the culprit of metabolic inflexibility: evidence from bed-rest studies. *J Appl Physiol* (1985). 2011;**111**(4):1201–1210.
9. Rynders CA, Blanc S, DeJong N, Bessesen DH, Bergouignan A. Sedentary behaviour is a key determinant of metabolic inflexibility [published online ahead of print June 10, 2016]. *J Physiol*.

10. Bergouignan A, Antoun E, Momken I, Schoeller DA, Gauquelin-Koch G, Simon C, Blanc S. Effect of contrasted levels of habitual physical activity on metabolic flexibility. *J Appl Physiol* (1985). 2013;114:371–379.
11. Stein TP, Donaldson MR, Leskiw MJ, Schluter MD, Baggett DW, Boden G. Branched-chain amino acid supplementation during bed rest: effect on recovery. *J Appl Physiol* (1985). 2003;94(4):1345–1352.
12. Ferrando AA, Paddon-Jones D, Wolfe RR. Alterations in protein metabolism during space flight and inactivity. *Nutrition*. 2002; 18(10):837–841.
13. Pal S, Ellis V, Dhaliwal S. Effects of whey protein isolate on body composition, lipids, insulin and glucose in overweight and obese individuals. *Br J Nutr*. 2010;104(5):716–723.
14. Bortolotti M, Maiolo E, Corazza M, Van Dijke E, Schneiter P, Boss A, Carrel G, Giusti V, Lê KA, Quo Chong DG, Buehler T, Kreis R, Boesch C, Tappy L. Effects of a whey protein supplementation on intrahepatocellular lipids in obese female patients. *Clin Nutr*. 2011; 30(4):494–498.
15. Hamad EM, Taha SH, Abou Dawood AG, Sitohy MZ, Abdel-Hamid M. Protective effect of whey proteins against nonalcoholic fatty liver in rats. *Lipids Health Dis*. 2011;10(1):57.
16. Turner KM, Keogh JB, Clifton PM. Dairy consumption and insulin sensitivity: a systematic review of short- and long-term intervention studies. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2015;25(1):3–8.
17. Buehlmeier J, Mulder E, Noppe A, Frings-Meuthen P, Angerer O, Rudwill F, Biolo G, Smith SM, Blanc S, Heer M. A combination of whey protein and potassium bicarbonate supplements during head-down-tilt bed rest: presentation of a multidisciplinary randomized controlled trial (MEP study). *Acta Astronaut*. 2014;95: 82–91.
18. Fettman MJ. Dietary instead of pharmacological management to counter the adverse effects of physiological adaptations to space flight. *Pflugers Arch*. 2000;441(2–3, suppl)R15–R20.
19. Belavý DL, Armbrecht G, Gast U, Richardson CA, Hides JA, Felsenberg D. Countermeasures against lumbar spine deconditioning in prolonged bed rest: resistive exercise with and without whole body vibration. *J Appl Physiol* (1985). 2010;109(6):1801–1811.
20. Beysen C, Murphy EJ, McLaughlin T, Riiff T, Lamendola C, Turner HC, Awada M, Turner SM, Reaven G, Hellerstein MK. Whole-body glycolysis measured by the deuterated-glucose disposal test correlates highly with insulin resistance in vivo. *Diabetes Care*. 2007;30(5):1143–1149.
21. Abdul-Ghani MA, Matsuda M, Balas B, DeFronzo RA. Muscle and liver insulin resistance indexes derived from the oral glucose tolerance test. *Diabetes Care*. 2007;30(1):89–94.
22. Frayn KN. Calculation of substrate oxidation rates in vivo from gaseous exchange. *J Appl Physiol*. 1983;55(2):628–634.
23. Bergouignan A, Trudel G, Simon C, Chopard A, Schoeller DA, Momken I, Votruba SB, Desage M, Burdge GC, Gauquelin-Koch G, Normand S, Blanc S. Physical inactivity differentially alters dietary oleate and palmitate trafficking. *Diabetes*. 2009;58(2):367–376.
24. Lesgards JF, Durand P, Lassarre M, Stocker P, Lesgards G, Lanteaume A, Prost M, Lehucher-Michel MP. Assessment of lifestyle effects on the overall antioxidant capacity of healthy subjects. *Environ Health Perspect*. 2002;110(5):479–486.
25. Pagano AF, Demangel R, Brioché T, Jublanc E, Bertrand-Gaday C, Candau R, Dechesne CA, Dani C, Bonniou A, Py G, Chopard A. Muscle regeneration with intermuscular adipose tissue (IMAT) accumulation is modulated by mechanical constraints. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144230.
26. Galgani JE, Moro C, Ravussin E. Metabolic flexibility and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295(5): E1009–E1017.
27. Yanagibori R, Suzuki Y, Kawakubo K, Makita Y, Gunji A. Carbohydrate and lipid metabolism after 20 days of bed rest. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1994;616:51–57.
28. Bergouignan A, Schoeller DA, Normand S, Gauquelin-Koch G, Laville M, Shriver T, Desage M, Le Maho Y, Ohshima H, Gharib C, Blanc S. Effect of physical inactivity on the oxidation of saturated and monounsaturated dietary fatty acids: results of a randomized trial. *PLoS Clin Trials*. 2006;1(5):e27.
29. Blanc S, Normand S, Pachiardi C, Fortrat J-O, Laville M, Gharib C. Fuel homeostasis during physical inactivity induced by bed rest. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(6):2223–2233.
30. Alibegovic AC, Højbjerg L, Sonne MP, van Hall G, Stallknecht B, Dela F, Vaag A. Impact of 9 days of bed rest on hepatic and peripheral insulin action, insulin secretion, and whole-body lipolysis in healthy young male offspring of patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2009;58(12):2749–2756.
31. Sonne MP, Alibegovic AC, Højbjerg L, Vaag A, Stallknecht B, Dela F. Effect of 10 days of bedrest on metabolic and vascular insulin action: a study in individuals at risk for type 2 diabetes. *J Appl Physiol* (1985). 2010;108(4):830–837.
32. Kenny HC, Rudwill F, Breen L, Salanova M, Blottner D, Heise T, Heer M, Blanc S, O’Gorman DJ. Bed rest and resistive vibration exercise unveil novel links between skeletal muscle mitochondrial function and insulin resistance. *Diabetologia*. 2017;60(8): 1491–1501.
33. Blanc S, Normand S, Pachiardi C, Duvareille M, Gharib C. Leptin responses to physical inactivity induced by simulated weightlessness. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000;279(3): R891–R898.
34. Ampuero J, Ranchal I, Gallego-Durán R, Pareja MJ, Del Campo JA, Pastor-Ramírez H, Rico MC, Picón R, Pastor L, García-Monzón C, Andrade R, Romero-Gómez M. Oxidized low-density lipoprotein antibodies/high-density lipoprotein cholesterol ratio is linked to advanced non-alcoholic fatty liver disease lean patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016;31(9):1611–1618.
35. Li S, Shin HJ, Ding EL, van Dam RM. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2009;302(2):179–188.
36. Dirks ML, Wall BT, van de Valk B, Holloway TM, Holloway GP, Chabowski A, Goossens GH, van Loon LJ. One week of bed rest leads to substantial muscle atrophy and induces whole-body insulin resistance in the absence of skeletal muscle lipid accumulation. *Diabetes*. 2016;65(10):2862–2875.
37. Biensø RS, Ringholm S, Kiilerich K, Aachmann-Andersen NJ, Krogh-Madsen R, Guerra B, Plomgaard P, van Hall G, Treebak JT, Saltin B, Lundby C, Calbet JA, Pilegaard H, Wojtaszewski JF. GLUT4 and glycogen synthase are key players in bed rest-induced insulin resistance. *Diabetes*. 2012;61(5):1090–1099.
38. McGregor RA, Poppitt SD. Milk protein for improved metabolic health: a review of the evidence. *Nutr Metab (Lond)*. 2013;10(1): 46.
39. Blottner D, Bosutti A, Degens H, Schiffel G, Gutschmann M, Buehlmeier J, Rittweger J, Ganse B, Heer M, Salanova M. Whey protein plus bicarbonate supplement has little effects on structural atrophy and proteolysis marker immunopatterns in skeletal muscle disuse during 21 days of bed rest. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2014;14(4): 432–444.
40. Smith GI, Yoshino J, Stromsdorfer KL, Klein SJ, Magkos F, Reeds DN, Klein S, Mittendorfer B. Protein ingestion induces muscle insulin resistance independent of leucine-mediated mTOR activation. *Diabetes*. 2015;64(5):1555–1563.
41. Koch M, Borggrefe J, Schlesinger S, Barbaresko J, Groth G, Jacobs G, Lieb W, Laudes M, Müller MJ, Bösby-Westphal A, Heller M, Nöthlings U. Association of a lifestyle index with MRI-determined liver fat content in a general population study. *J Epidemiol Community Health*. 2015;69(8):732–737.
42. Westerterp KR. Physical activity, food intake, and body weight regulation: insights from doubly labeled water studies. *Nutr Rev*. 2010;68(3):148–154.



## Effect of a nutritional countermeasure on metabolic inflexibility induced by weightlessness simulation in humans

### Résumé en anglais

Space missions and bedrest simulation studies have shown that physical inactivity affects all physiological systems in humans. In prolonged bed rest conditions, our laboratory (UMR7178, IPHC, DEPE, Strasbourg) showed that metabolic adaptations were close to that found in the metabolic syndrome associated with metabolic chronic diseases in the general population. Based on these results, we proposed a hypothesis to describe the cascade of events leading to metabolic alterations in simulated microgravity, leading to the development of metabolic inflexibility. Metabolic inflexibility is defined as the inability of the body to adjust fuel use to changes in fuel availability. The first objective of this Thesis was to test this hypothesis and understand the mechanisms underlying the simulated microgravity induced metabolic alterations. Specifically, we focused on characterizing the metabolic inflexibility syndrome in humans through clinical investigation of muscle condition, inflammation and oxidative stress, insulin sensitivity and oxidation of energy substrates in a proof of concept study and a 60-day microgravity simulation study in healthy male adults. Based on recent studies demonstrating the impact of nutritional supplements on metabolic adaptations associated with many chronic metabolic diseases, a proof-of-concept study tested the efficacy of a nutritional cocktail composed of polyphenols, omega-3, vitamin E and selenium. In the feasibility study, we showed that supplementation reduced muscle atrophy, oxidative stress and the development of metabolic inflexibility via an improvement in lipid oxidation and a reduction in de novo lipogenesis following a 20-day period of physical inactivity induced by daily step reduction. Based on these first results, a 60-day bed rest study was conducted in health men to test the effects of the dietary cocktail in simulated microgravity conditions. In this second human clinical research study, nutritional supplementation prevented at least partially acute and chronic adaptations caused by physical inactivity induced by bed rest. In particular, supplementation increased antioxidant blood defenses, prevented increased lipid levels, reduced lipid oxidation and mitigated the development of acute and chronic metabolic inflexibility in absence of metabolic challenge. However, the countermeasure did not have a protective effect following a metabolic challenge in the form of carbohydrate overnutrition. All the results indicate that the development of metabolic inflexibility appears to be an early event, which, if detected in time, could prove to be a useful biomarker to use to prevent chronic diseases in the 21st century. Moreover, this study demonstrated the advantage of an antioxidant and anti-inflammatory cocktail by limiting metabolic alterations without having harmful effects on other systems, while being easy to implement and cost-effective. Even if the nutritional countermeasure used in this study is not sufficient to keep all physiological systems intact, further studies will have to be carried out to find the ideal combination of countermeasures to limit microgravity-induced degradation and thus allow new advances in space exploration (Moon, Mars) over the next decades. In this line, an adapted protocol of physical activity combined with a nutritional countermeasure in the form of a cocktail could be a promising approach.

**Keywords:** microgravity; physical inactivity; metabolic flexibility; metabolism; nutrition

Effet d'une contremesure nutritionnelle sur l'inflexibilité  
métabolique induite par simulation d'impesanteur chez  
l'homme

## Résumé

Les missions spatiales et les études de simulation par alitement prolongé ont montré que l'inactivité physique induite par la microgravité affecte l'ensemble des systèmes physiologiques chez l'humain. En condition d'alitement prolongé notre laboratoire (UMR7178, IPHC, DEPE, Strasbourg) a montré que l'adaptation métabolique était proche de celle retrouvée dans le syndrome métabolique associé, dans la population générale, à de nombreuses pathologies. Une hypothèse a été émise pour décrire la cascade des événements entraînant les dérèglements métaboliques en microgravité simulée. Cette cascade d'adaptions aurait pour conséquence le développement d'un état d'inflexibilité métabolique, définie comme une incapacité à ajuster l'utilisation des nutriments comme substrats aux changements de disponibilité des nutriments et dont la compréhension reste toutefois incomplète. Lors de ce projet de thèse, nous nous sommes attachés à caractériser le syndrome d'inflexibilité métabolique chez l'Humain à travers l'investigation clinique de l'état musculaire, de l'inflammation et du stress oxydant, de la sensibilité à l'insuline et de l'oxydation des substrats énergétiques au cours d'une étude de preuve de concept et d'une étude de simulation de microgravité de 60 jours. Sur la base d'études récentes démontrant l'impact de compléments nutritionnels sur les adaptations métaboliques associées à de nombreuses maladies métaboliques chroniques, une étude de preuve de concept a permis de tester l'efficacité d'un cocktail nutritionnel composé de polyphénols, d'oméga-3, de vitamine E et de sélénium. La supplémentation a permis de réduire l'atrophie musculaire, le stress oxydant et le développement d'une inflexibilité métabolique par l'intermédiaire d'une meilleure oxydation lipidique et d'une réduction de la lipogenèse *de novo* suite à une période d'inactivité physique de 20 jours. Sur la base de ces premiers résultats, une étude d'alitement de 60 jours a été menée chez l'Humain pour tester les effets du cocktail nutritionnel en condition de microgravité simulée. Dans cette seconde étude, la supplémentation nutritionnelle a permis de prévenir au moins partiellement des adaptations aiguës et chroniques engendrées par l'inactivité physique au cours de l'alitement. En particulier la supplémentation a augmenté les défenses sanguines anti-oxydantes, a prévenu l'augmentation de la lipidémie et la réduction de l'oxydation lipidique et a contenu le développement d'une inflexibilité métabolique aiguë et chronique en absence de challenge métabolique. Toutefois la contremesure n'a pas eu d'effet protecteur suite à un challenge métabolique sous forme de surnutrition glucidique. L'ensemble des résultats indique que le développement d'une inflexibilité métabolique apparaît comme un événement précoce, qui, décelé à temps pourrait se révéler comme un biomarqueur d'intolérance au glucose dans des stratégies de prévention des maladies chroniques du XXIème siècle. Plus encore, cette étude a permis de démontrer l'atout d'un cocktail antioxydant et anti-inflammatoire en limitant les altérations métaboliques sans avoir d'effets néfastes sur les autres systèmes, tout en étant une contremesure facile à mettre en œuvre et peu coûteuse. Quand bien même la contremesure nutritionnelle utilisée lors de cette étude ne serait pas suffisante pour maintenir l'ensemble des systèmes physiologiques intacts, d'autres études devront être menées afin de trouver la combinaison de contremesures idéale permettant de limiter les dégradations induites par la microgravité et ainsi permettre des nouvelles avancées dans l'exploration spatiale (Lune, Mars) au cours des prochaines décennies. En ce sens, un protocole adapté d'activité physique combiné à une contremesure nutritionnelle sous forme de cocktail semble être une piste prometteuse.

Mots clés : microgravité ; inactivité physique ; flexibilité métabolique ; métabolisme ; nutrition