

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

**MÉMOIRE DE RECHERCHE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRE**

**PAR  
VALÉRIE BEAULIEU, B. Sc. (Biologie Médicale)**

**MODIFICATIONS INDUITES PAR L'ENTRAÎNEMENT EN ENDURANCE SUR  
LA COMPARTIMENTATION ET LA STRUCTURE DU GLYCOGÈNE  
HÉPATIQUE**

**31 Juillet 2002**

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## REMERCIEMENTS

Dr Carole Lavoie, Ph.D.  
Directeur du laboratoire de biochimie de l'exercice chez l'animal  
Département des sciences de l'activité physique

### **Les membres du laboratoire:**

Réjean Drouin, M.Sc.

Martin Milot, M.Sc.

Geneviève Robert, B.Sc.

Madame Rollande Caron, responsable de l'animalerie

Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR)

Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada  
(CRSNG)

Association Canadienne du Diabète (ACD)

## MODIFICATIONS INDUITES PAR L'ENTRAÎNEMENT EN ENDURANCE SUR LA COMPARTIMENTATION ET LA STRUCTURE DU GLYCOGÈNE HÉPATIQUE

### **Résumé:**

La structure et le contenu hépatique en glycogène associé aux lyoglycosomes et aux desmoglycosomes ont été étudiés chez des rats mâles Sprague-Dawley entraînés et sédentaires. Le programme d'entraînement consistait en 3 heures de nage par jour, 5 jours par semaine et ce pour une durée totale de 8 semaines. À la fin des 8 semaines d'entraînement, 48 heures après la dernière séance d'exercice et après une nuit avec libre accès à la nourriture, les animaux ont été sacrifiés. La quantité de glycogène hépatique et la quantité de glycogène associé aux lyoglycosomes étaient similaires chez les animaux sédentaires et entraînés. Cependant, une quantité plus importante de glycogène associé aux desmoglycosomes a été retrouvée chez les animaux entraînés comparativement aux sédentaires. D'autre part, l'entraînement en endurance a induit un changement dans la structure du glycogène hépatique se traduisant par une augmentation de 31% du nombre de glucoses impliqués dans les branchements, une diminution du nombre de résidus glucose par chaîne ( $8,7 \pm 0,9$  vs  $11,4 \pm 0,5$  unités glucose/chaîne,  $P < 0,01$ ) et une augmentation du nombre de niveaux ( $10,4 \pm 0,2$  vs  $9,8 \pm 0,1$  niveaux,  $P < 0,01$ ). De plus un nombre plus élevé de chaînes A (52%) a été observé chez les animaux entraînés formant ainsi une particule de glycogène plus compacte ayant un rayon et un volume réduits (14% et 33% respectivement,  $P < 0,01$ ) par rapport à celle des animaux sédentaires. En conclusion, les résultats obtenus au cours de cette étude démontrent que l'entraînement en endurance 1) ne modifie pas la quantité de glycogène hépatique mais change sa qualité et 2) optimise la molécule de glycogène hépatique en modifiant sa structure et en augmentant son association aux desmoglycosomes. L'optimisation de la

structure du glycogène hépatique par l'entraînement pourrait expliquer la facilité de la réponse glycogénique induite par le glucagon.

Mots clés: structure du glycogène, entraînement en endurance, exercice, glycosomes, foie.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>ii</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>iii</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>v</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>ix</b>
 <b>CHAPITRE 1      INTRODUCTION .....</b>	 <b>1</b>
1.1 Source d'énergie .....	1
1.2 Le glycogène .....	
1.2.1 Définition du glycogène .....	2
1.2.2 Structure du glycogène .....	
1.2.2.1 Structure de base .....	3
1.2.2.2 Modèle de Meyer.....	4
1.2.2.3 Modèle de Whelan .....	5
1.2.2.4 Modèle de Meléndez.....	7
1.2.2.5 Structure fractale du glycogène.....	11
 <b>CHAPITRE 2      HÉTÉROGÉNÉITÉ DU GLYCOGÈNE .....</b>	 <b>14</b>
2.1 Glycogène cytoplasmique et lysosomal .....	14
2.2 Lyoglycogène et desmoglycogène .....	16
2.3 Glycosomes .....	
2.3.1 La notion de glycosome .....	19
2.3.2 Association enzymes-glycogène .....	20
2.4 Proglycogène et macroglycogène .....	24
2.5 Avancées récentes.....	25

<b>CHAPITRE 3</b>	<b>MODIFICATIONS DES RÉSERVES DE GLYCOGÈNE.....</b>	<b>28</b>
3.1	Effet de l'exercice aigu et chronique	
3.1.1	Modifications du glycogène musculaire.....	28
3.1.2	Modifications du glycogène hépatique .....	29
3.2	Objectifs .....	32
<b>CHAPITRE 4</b>	<b>MÉTHODOLOGIE .....</b>	<b>34</b>
4.1	Protocole expérimental.....	34
4.2	Analyses	
4.2.1	Citrate synthétase .....	35
4.2.2	Étude du glycogène.....	36
4.2.2.1	Purification du glycogène .....	36
4.2.2.2	Contenu en glycogène .....	36
4.2.2.3	Structure du glycogène .....	37
4.2.3	Compartimentation du glycogène: lyo- et desmoglycosomes.....	39
4.3	Statistique.....	40
<b>CHAPITRE 5</b>	<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>41</b>
<b>CHAPITRE 6</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>46</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>.....</b>	<b>55</b>

## LISTE DES TABLEAUX

1.1 Variation de la densité et du nombre total de glucoses disponibles pour la glycogène phosphorylase (Gpt) en fonction du nombre de branchements (r) et de niveaux (t).....	13
2.1 Représentation des diverses fractions du glycogène.....	18
3.1 Revue de l'effet de l'entraînement sur les réserves de glycogène hépatique .....	31
5.1 Glycogène total et associé aux lyoglycosomes et desmoglycosomes dans le foie des animaux sédentaires et entraînés.....	42
5.2 Effet de l'entraînement en endurance sur la structure du glycogène hépatique (partie 1) .....	43
5.3 Effet de l'entraînement en endurance sur la structure du glycogène hépatique (partie 2) .....	44



## LISTE DES FIGURES

1.1 Structure de base du glycogène .....	4
1.2 Molécule de glycogène selon le modèle de Meyer-Bernfeld .....	5
1.3 Molécule de glycogène selon le modèle de Whelan .....	7
1.4 Schéma représentant la structure du glycogène hépatique .....	8
2.1 Schéma illustrant des rosettes de glycogène avec particules $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$ .....	21
2.2 Rosettes de glycogène (particules $\alpha$ , flèches blanches) et glycogène (zones non-colorées; flèches noires).....	22
2.3 Arrangement des glycosomes .....	27
4.1 Programme d'entraînement à la nage.....	35
5.1 Pourcentage du glycogène total présent dans les fractions de glycogène hépatique des animaux sédentaires et entraînés.....	42

## LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

AMPC	adénosine monophosphate cyclique
ADP	adénosine diphosphate
ATP	adénosine triphosphate
$^{14}\text{C}$	carbone 14
$\text{C}_A$	nombre de chaînes A
CoASH	coenzyme A
$\text{C}_T$	nombre de chaînes totales
DNTB	5,5'-dithiobis-(2-nitro-benzoate)
éd.	édition
EDTA	acide éthylènediaminetétracétate
<i>et al.</i>	<i>et alumni</i> , identifie plus de 2 auteurs
FDH	formate déshydrogénase
g	gramme
G1-P	glucose 1-phosphate
G6-P	glucose 6-phosphate
G6-Pase	glucose 6-phosphatase
GLUT	transporteur de glucose
GP	glycogène phosphorylase
Gpt	résidus glucose disponibles à la phosphorylase
GS	glycogène synthétase
HCl	acide chlorhydrique
MG	macroglycogène
NAD	adénine nicotinamide dinucléotide
NADH	adénine nicotinamide dinucléotide réduit
PA-Schiff	acide périodique de Schiff
PCA	acide perchlorique
PG	proglycogène
PHG	production hépatique de glucose

r	degré de branchement
rpm	rotations par minute
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide-sodium dodecyl sulfate
TCA	acide trichloroacétique
U/Pb	uranyl/plomb
UDPG	uridine diphosphoglucose
V <sub>s</sub>	volume total de la molécule de glycogène

# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

### 1.1 SOURCE D'ÉNERGIE

L'organisme est doté de deux voies métaboliques permettant de réguler la glycémie: la glycogénolyse qui utilise les réserves de glycogène du foie et la néoglucogenèse qui transforme le glycérol, le lactate, le pyruvate ainsi que certains acides aminés provenant du catabolisme des protéines pour synthétiser du glucose. La diminution du taux de glucose sanguin induit, entre autres, une variation des taux circulants d'insuline et de glucagon permettant au foie de répondre en augmentant la production de glucose (62).

Le glycogène est emmagasiné principalement dans les muscles et le foie. Pour une personne de 70 kg, environ 70 g de glycogène se retrouve dans le foie et 400 g dans les muscles (78). Lors d'une activité physique prolongée, une partie de l'énergie nécessaire au bon fonctionnement des muscles est fournie par la dégradation du glycogène. De nombreuses études ont été menées sur l'effet de l'exercice sur le métabolisme du glycogène musculaire (5, 19, 33, 58). En effet, Cartee *et al.*, Baldwin K.M. *et al.* Nakatani A. *et al.* et Greiwer J.S. *et al.* entre autres ont étudié l'effet de l'entraînement en endurance sur le métabolisme du glycogène musculaire. Ces études ont montré que l'entraînement en endurance augmentait la capacité du muscle à accumuler du glycogène par un mécanisme nommé *surcompensation du glycogène*. Cependant, l'impact d'un entraînement en endurance sur le métabolisme du glycogène hépatique ne demeure encore que très partiellement élucidé. La glycogénolyse hépatique stimulée par le glucagon a été étudiée chez des rats sédentaires ou ayant suivi un entraînement en endurance; ces travaux ont mis en évidence une réponse accrue au glucagon chez les rats entraînés et ce pour une même quantité de

glycogène et une activité de la glycogène phosphorylase (GP) identique à celle des rats sédentaires (24). Quelles sont les adaptations induites par l'entraînement en endurance responsables des changements dans la réponse au glucagon? Parmi les facteurs responsables de la réponse glycogénolytique, outre la quantité de glycogène et les activités enzymatiques, se retrouve la structure même de la molécule de glycogène. Des études récentes visent à clarifier la relation entre la structure du glycogène et son métabolisme ainsi qu'à déterminer une structure optimale pour cette molécule (54). L'entraînement en endurance pourrait modifier la structure de la molécule du glycogène et avoir des répercussions sur la glycogénolyse hépatique stimulée par le glucagon.

## **1.2 LE GLYCOGÈNE**

### **1.2.1 Définition du glycogène**

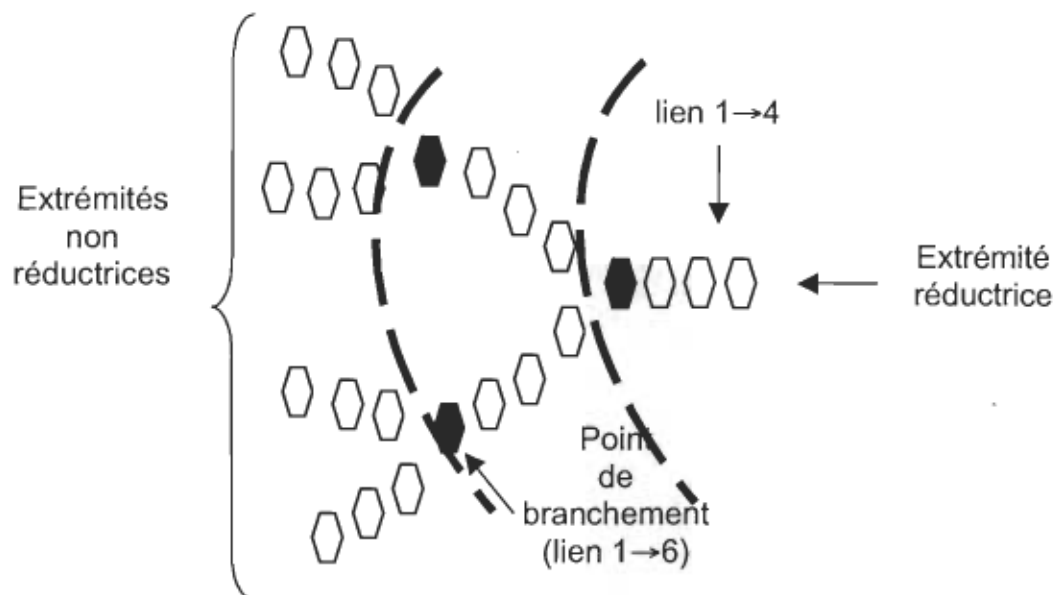
La notion de glycogène a été introduite au milieu du 19<sup>ème</sup> siècle: la molécule a été isolée pour la première fois par Claude Bernard en 1850 (11). Ce dernier a établi que la production de glucose par le foie avait pour origine une substance qu'il a appelée glycogène. La formation du glucose était alors expliquée par une succession de deux événements (activités vitale et chimique). Dans un premier temps, le glycogène était produit par le foie, puis dans un second temps il était métabolisé en glucose par une enzyme. La découverte de Bernard (11) fut à l'origine de très nombreux travaux qui se poursuivent encore aujourd'hui. Ces travaux ont pour but de mieux comprendre le métabolisme du glycogène et de déterminer sa structure.

Le glycogène est la principale source de mise en réserve du glucose. Il est rapidement utilisable par les muscles squelettiques et le cœur. Le corps humain peut emmagasiner un total de 500 g de glycogène dans le foie et dans les muscles. Environ 80% de ce glycogène est retrouvé au niveau des muscles (79). Le glycogène représente 1 à 2% du poids du muscle et 6 à 10% du poids du foie (61). Malgré la forte concentration de glycogène au niveau du foie, le poids de ce dernier étant relativement faible, la quantité totale de glycogène s'y trouvant est moindre que dans les muscles squelettiques (61). Le glycogène musculaire n'est pas facilement accessible aux autres tissus car l'enzyme glucose 6-phosphatase n'est pas exprimée dans le muscle; ce glycogène n'est donc pas utilisé pour subvenir aux besoins glucidiques des autres tissus, contrairement au glycogène hépatique (79).

### **1.2.2 Structure du glycogène**

#### **1.2.2.1 Structure de base du glycogène**

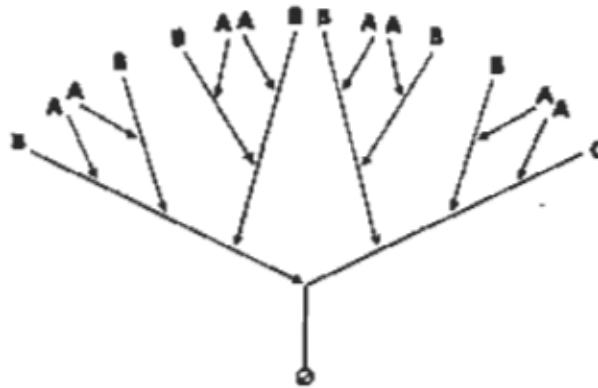
Le glycogène est un polysaccharide dont la structure complexe et hautement ramifiée permet de répondre rapidement à la demande en énergie des tissus environnants. Il est constitué d'unités glucose (figure 1.1 (63)) reliées entre elles par des liens 1→4 formés par des unités glucosyl entre les carbones en positions 1 et 4 et de branchements au niveau des liens 1→6 formés par des unités glucosyl entre les carbones en positions 1 et 6.



**FIGURE 1.1:** Structure de base du glycogène.  
Adaptée de: *Experimental Methods in Modern Biochemistry* (63)

#### 1.2.2.2 Modèle de Meyer

Depuis plus de 60 ans, plusieurs modèles de structure du glycogène ont été proposés et encore aujourd'hui font l'objet d'affinements. Dès 1940, Meyer et Bernfeld (34) proposaient un modèle décrivant le glycogène comme une molécule ayant une structure branchée de façon régulière (figure 1.2, (34)). Selon ces derniers, trois types de chaînes étaient présentes. Les chaînes de glucose dites chaînes A et B étaient liées au centre de la molécule par leur extrémités réductrices. Cependant, les chaînes B supportaient en plus d'autres chaînes A ou B. Les liaisons de ces chaînes A ou B impliquaient un ou plusieurs groupements hydroxyl. Toujours selon ce modèle, chaque molécule contenait une chaîne C qui servait de support aux autres chaînes A ou B. Quantitativement, ce modèle permettait donc d'obtenir un ratio A:B =1 (34).



**FIGURE 1.2:** Molécule de glycogène selon le modèle Meyer-Bernfeld. Adaptée de Gunja-Smith *et al.* 1970 (34)

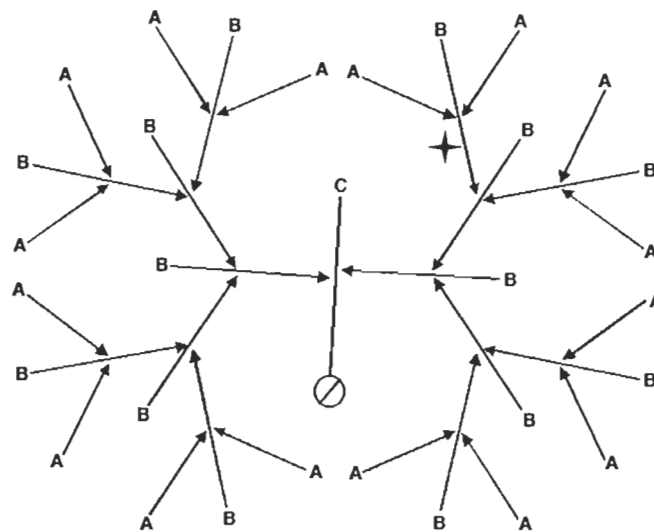
### 1.2.2.3 Modèle de Whelan

Il aura fallu attendre 30 ans pour que des ajustements soient apportés à ce premier modèle. En 1970, Whelan *et al.* (34) proposaient une première modification au modèle de Meyer (figure 1.3). L'équipe de Whelan a démontré que les chaînes A et B n'étaient pas organisées de façon régulière. Pour se faire, ils ont utilisé deux enzymes: la  $\beta$ -amylase qui débranchait totalement le glycogène sans couper les liens  $1 \rightarrow 6$   $\alpha$  maltosyl et la glycogène phosphorylase qui coupait les liaisons glycosidiques  $1 \rightarrow 4$ . À l'aide de ces deux enzymes, des unités résistantes à l'amylase (liens  $1 \rightarrow 6$ ) ont été créées. Les chaînes A étaient réduites uniformément à une longueur égale à deux unités glucose. Comme la  $\beta$ -amylase n'hydrolysait que les liens  $1 \rightarrow 4$ , les chaînes A étaient seulement réduites jusqu'au niveau des branchements (liens  $1 \rightarrow 6$ ). Par contre, les liens



entre deux chaînes B étaient eux hydrolysés (liens 1→4). D'après le modèle de Meyer, chaque chaîne B se terminait près d'une extrémité non-réductrice appartenant à une chaîne A (liens 1→6). La  $\beta$ -amylase n'agissant pas sur les liens 1→6, la molécule n'était pas complètement débranchée et l'action de la  $\beta$ -amylase était nulle. Cependant, d'après les expériences de Whelan *et al.* (34), l'activité de la  $\beta$ -amylase n'est pas nulle. Selon les auteurs, plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette observation; un certain nombre de chaînes B ne porterait pas de chaînes A ou bien les chaînes A ne seraient pas accessibles aux enzymes (glycogène phosphorylase et  $\beta$ -amylase). L'inaccessibilité des chaînes A aux enzymes correspond au concept de "chaînes cachées" employé par French (34). Ce concept stipule qu'il est peu probable que toutes les chaînes de la molécule de glycogène s'allongent en même temps (34).

À partir de ces résultats, la structure du glycogène peut être décrite comme suit: la molécule est formée de deux types de chaînes d'une longueur de 13 résidus glucose: les chaînes B qui sont branchées et les chaînes A qui ne le sont pas. Seules les chaînes B sont branchées de façon uniforme et possèdent deux branches formant ainsi de nouvelles chaînes A ou B (figure 1.3, (34, 35)). Chaque branchement est séparé par quatre résidus glucose.



**FIGURE 1.3:** Molécule de glycogène selon le modèle de Whelan.

Adaptée de Gunja-Smith Z. *et al.*, 1970 (34, 35)

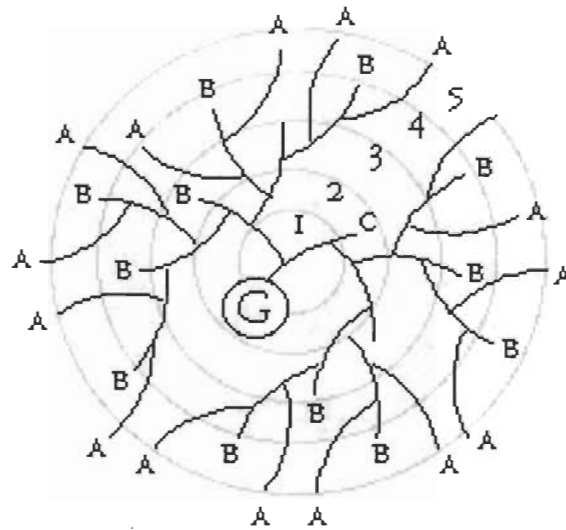
⊙: glycogénine

✦ = distance de 4 résidus

#### 1.2.2.4 Modèle de Meléndez

En 1993, Meléndez *et al.* ont proposé un premier modèle mathématique (figure 1.4) de la molécule "optimale" de glycogène. Ce modèle est basé sur celui proposé par Whelan *et al.* en 1970 (figure 1.3 (34, 35)). Globalement, Meléndez *et al.* ont identifié une molécule de glycogène sphérique formée de plusieurs niveaux concentriques. Une molécule complète possède 12 niveaux. Le concept de chaînes A et B identifié par Meyer *et al.* a été conservé chez Meléndez. La molécule de glycogène est donc formée de chaînes A (ou chaînes externes) qui sont non branchées (lien 1→4) et de chaînes B qui sont branchées (branchements au niveau des liens 1→6). Chaque chaîne A possède une longueur moyenne de 13 unités glucose et chaque chaîne B possède deux branchements. Les branchements sont séparés par quatre résidus glucose. Avec ce modèle, un degré de branchement supérieur à deux

se traduirait par une augmentation de la densité de la molécule de glycogène et réduirait la capacité à emmagasiner du glucose.



**FIGURE 1.4:** Schéma représentant la structure du glycogène hépatique. Adaptée de Meléndez-Hevia *et al.* 1993 (55).

Le modèle de Meléndez fait intervenir quatre variables qui seront modifiées selon l'état de synthèse ou de dégradation du glycogène: 1)  $C_A$  : le nombre de chaînes A; 2)  $G_T$  : le nombre total de résidus glucose emmagasinés dans la molécule; 3)  $G_{pt}$  : le nombre de résidus accessibles à la phosphorylase et 4)  $V_s$  : le volume total de la molécule en  $nm^3$ . Ces quatre variables dépendent de trois paramètres. Les paramètres utilisés par Meléndez sont les valeurs optimales du degré de branchement, du nombre de niveaux et du nombre de résidus glucose qui correspondent aux valeurs mesurées du glycogène cellulaire (51), soit:

- 1)  $r$ , le degré de branchement;
- 2)  $t$ , le nombre de niveaux, ( $t_{max}$  étant le nombre maximal de niveaux)

3)  $g_c$ , le nombre de résidus glucose par chaîne.

Lorsque la valeur d'un de ces paramètres diffère de celle du glycogène cellulaire, une molécule de glycogène aux propriétés différentes est formée.

À partir des trois paramètres de base constituant le modèle de Meléndez *et al.*, des équations ont été définies (55):

$$1) C_A = r^{(l-1)}$$

$$2) G_T = g_c \cdot (1-r^l) / 1-r, \text{ où } g_c = \text{la longueur de chaînes}$$

$$3) G_{pt} = C_A \cdot (g_c - 4), \text{ où } 4 = \text{espace minimum pour la phosphorylase}$$

$$4) V_s = 4/3 \pi \cdot t^3 \cdot (0,12g_c + 0,35)^3$$

Selon Meléndez *et al.* (55), le degré de branchement de la molécule de glycogène ne peut pas être plus élevé que deux car de façon théorique ceci entraînerait la formation d'une molécule trop dense qui empêcherait la glycogène phosphorylase de se lier. La dégradation du glycogène par la glycogène phosphorylase (GP) est un mécanisme complexe. La GP est une molécule tétramérique et pour des raisons de stœchiométrie l'enzyme a besoin d'un espace suffisant au niveau de ses sites de liaison avec le glycogène. La dégradation du glycogène par la GP se fait au niveau des liens 1→4, qui sont eux attaqués par une seule molécule de GP. Dû à la structure de la molécule de glycogène, les liens 1→4 d'une molécule ayant un degré de branchement supérieur à deux ne peuvent adopter l'orientation spatiale requise pour la GP. Comme la GP travaille sur une seule chaîne à la fois, les autres sites actifs pour la phosphorylase perdent leur capacité à lier leurs unités glucosyl (55). Ce phénomène peut cependant être atténué si les chaînes extérieures (chaînes A,

exposées à la GP) sont suffisamment longues et nombreuses pour permettre plus de flexibilité à la GP et garantir que la perte d'un site actif pour la GP puisse être rapidement remplacé par celui d'une autre chaîne située à proximité.

Tel que mentionné précédemment, une molécule de glycogène ne peut pas posséder un degré de branchement supérieur à deux. L'augmentation du degré de branchement diminue le nombre de niveaux et ce pour un même nombre de résidus. Par exemple, d'après les équations de Meléndez, une molécule de glycogène de même densité que le glycogène cellulaire ayant un degré de branchement égal à trois ne pourrait avoir que sept niveaux. Une telle molécule ne serait donc pas optimale (55) puisque le nombre de glucoses disponibles à la GP se trouve alors réduit. Un degré de branchement supérieur à deux se traduit aussi par une augmentation de la densité de la molécule de glycogène et une diminution de sa capacité à emmagasiner du glucose, incompatible avec l'optimisation de la molécule. Le tableau 1.1 représente la variation de la densité et du nombre total de glucoses disponibles à la GP en fonction du nombre de branchements et de niveaux. Ce tableau compare les valeurs mesurées du glycogène cellulaire aux valeurs calculées à partir des équations ci-dessus.

Les résultats obtenus à l'aide des formules 1 et 2 (voir page 9) démontrent que le degré de branchement doit être égal à deux afin de garantir l'efficacité maximale pour le relargage de glucose (55). Le degré de branchement de la molécule de glycogène ne peut donc être très élevé. Un degré de branchement supérieur à deux formerait une molécule très dense empêchant ainsi l'action de la glycogène phosphorylase. Un degré de branchement de deux est précisément celui proposé antérieurement dans le modèle de Whelan (34, 35) et confirmé entre autres par Bullivant *et al.* en 1983 (14). De plus, toujours en

situation optimale, le nombre de glucoses par chaîne a été déterminé mathématiquement comme équivalent à 13 (54). Cette valeur est aussi celle identifiée par d'autres auteurs (38, 52, 53). Illingworth *et al.* présentaient déjà en 1952 une valeur moyenne de 12,91 pour la longueur de chaîne. Cette valeur a été déterminée à partir d'analyse de glycogène hépatique provenant de plusieurs espèces animales (foie de fœtus de cochon d'Inde, de rats Sprague-Dawley, rats Busch et de chats). Les travaux du groupe de Manners en 1957 et en 1962 (52, 53) supportaient déjà cette longueur de chaîne de 13 pour le glycogène musculaire et hépatique chez l'animal. Des travaux plus récents ont confirmé cette valeur pour le glycogène hépatique animal (34, 15) ainsi que pour le glycogène musculaire et ce indépendamment de l'espèce (70).

Suite aux travaux de Meléndez *et al.* (55), il est évident que l'efficacité métabolique du glycogène repose sur sa structure, en l'occurrence sa capacité à emmagasiner une très grande quantité de glucoses dans le moins d'espace possible. De plus, la structure du glycogène doit lui permettre de libérer rapidement un grand nombre de molécules de glucose afin de répondre aux diverses situations physiologiques (55).

#### **1.2.2.5 Structure fractale du glycogène**

Il existe plusieurs exemples où l'optimisation d'une structure permet d'atteindre le but visé et ce, de la façon la plus économique possible. C'est le cas des alvéoles pulmonaires et des capillaires sanguins qui peuvent être simulés par des fonctions mathématiques basées sur des algorithmes fractals (54). En 1999, Meléndez *et al.* ont étudié la structure fractale du glycogène. D'un point de vue mathématique, un objet fractal est une structure formée par la répétition à l'infini d'un même procédé. Une structure biologique fractale implique que sa

formation par la répétition d'un même procédé ait une véritable implication biologique (54). Quels sont alors les avantages métaboliques dérivés de la structure fractale du glycogène? Selon Meléndez *et al.* la structure fractale du glycogène confère les avantages suivants:

- 1) une rapidité de synthèse et de dégradation autorisant un relargage rapide de glucose 1- phosphate;
- 2) un mécanisme de régulation simple relevant de sa rapidité à fournir de l'énergie;
- 3) une optimisation facilitée puisque que le glycogène est synthétisé à partir de procédés simples impliquant deux enzymes, la glycogène synthétase et l'enzyme de branchement
- 4) ses propriétés fractales s'appliquent aussi à d'autres variables, par exemple lorsque le niveau extérieur est épuisé, le précédent de structure similaire répond à la demande. Prenons par exemple une molécule de glycogène ayant 12 niveaux, lorsque le dernier niveau est épuisé, le 11<sup>e</sup> niveau, de structure similaire, est alors utilisé fournissant ainsi une même concentration et un même pourcentage de glucoses à la glycogène phosphorylase.

TABLEAU 1.1

Variation de la densité et du nombre total de glucoses disponibles pour la glycogène phosphorylase (Gpt) en fonction du nombre de branchements (r) et de niveaux (t)

T	r = 1		r = 2		r = 3	
	Densité	Gpt	Densité	Gpt	Densité	Gpt
3	11,6	9	27	36	50	81
4	7,9	9	30	72	79	243
5	5,7	9	36	144	139	729
6	4,3	9	46	288	264	2187
7	3,4	9	62	576	<b>530*</b>	<b>6561*</b>
8	2,7	9	87	1152	1118	19 683
9	2,2	9	127	2304	2444	59 049
10	1,9	9	191	4608	5510	177 147
11	1,6	9	294	9216	12 733	531 441
12	1,4	9	<b>463*</b>	<b>18 432*</b>		
13	1,2	9	741	36 864		
14	1,0	9	1206	73 728		

\* Valeurs correspondant aux valeurs du glycogène cellulaire

\* Selon Meléndez *et al.* (55)



## CHAPITRE 2

### HÉTÉROGÉNÉITÉ DU GLYCOGÈNE

#### 2.1 GLYCOGÈNE CYTOSOLIQUE ET LYSOSOMAL

Depuis plusieurs années certains auteurs (18, 19, 31, 40, 67, 68, 69, 81) se sont attardés à la localisation intracellulaire du glycogène hépatique et musculaire. Ces différents travaux ont donné naissance à des concepts qui seront présentés dans ce chapitre.

Plusieurs équipes ont élaboré des hypothèses quant à la distinction des différentes fractions du glycogène. Ces dernières pouvaient être différenciées selon leur solubilité (81), leur poids moléculaire (18, 19, 31), leur ratio protéines:glucose (40) ou par la composition en protéines des glycosomes (67, 68, 69). Le tableau 2.1 résume la contribution de plusieurs auteurs à l'identification des différentes fractions du glycogène.

Les recherches menées par Friden *et al.* ont démontré que le glycogène n'était pas une substance homogène, mais plutôt hétérogène composée de différentes fractions (26). Cette équipe a étudié la localisation du glycogène musculaire chez des sujets sédentaires ou entraînés (*sprinters*). Cette étude a démontré que le glycogène était distribué dans différents compartiments intracellulaires et que l'utilisation du glycogène de ces compartiments dépendait du niveau d'entraînement du sujet. Les résultats obtenus suggèrent un rôle distinct du glycogène localisé dans les différents compartiments intracellulaires.

En étudiant la synthèse du glycogène hépatique par l'incorporation de molécules de glucose marqué au  $^{14}\text{C}$  chez des lapins nourris suite à une période de jeûne, Geddes et Stratton (30) ont observé que celle-ci était hétérogène. Deux types de molécules de glycogène étaient formées: une molécule résultant de la formation d'un polysaccharide de haut poids moléculaire contenant des protéines capables de former des ponts disulfures, et l'autre résultant de la formation d'un polysaccharide de faible poids moléculaire ayant peu ou pas de protéines capables de former des ponts disulfures. Une surproduction de glycogène de faible poids moléculaire étaient observée. Le réapprovisionnement des réserves de glycogène hépatique chez l'animal nourri suite à une période de jeûne favoriserait tout d'abord la synthèse de glycogène de faible poids moléculaire. Ce dernier serait ultérieurement converti en glycogène de haut poids moléculaire. La synthèse du glycogène s'accomplit donc en deux étapes successives, l'une formant une particule de faible poids moléculaire et l'autre de haut poids moléculaire. Mis à part leur différence de poids moléculaire, les deux particules de glycogène ne seraient pas différenciables (30).

La compartimentation du glycogène musculaire a aussi été suggérée par Calder et Geddes en 1989 (18). Dans cette étude, le glycogène provenant du muscle squelettique de rat a été séparé en deux fractions: l'une enrichie en lysosomes et l'autre en mitochondries. Les lysosomes et les mitochondries ont été séparés sur gradient discontinu de Ficoll-sucrose. La fraction mitochondriale contenait peu de glycogène (glycogène cytosolique) tandis que la fraction lysosomale était associée avec une quantité un peu plus importante de glycogène (environ 5% du glycogène musculaire). Cette dernière fraction était aussi enrichie en glycogène de haut poids moléculaire (glycogène lysosomal) (18). Utilisant l'incorporation de glucose radioactif ( $\text{D} - \text{U} \text{ } ^{14}\text{C}$  glucose) dans le glycogène, cette même équipe observa, chez des rats nourris après une période de jeûne de 40 heures, que la synthèse du glycogène

hépatique et musculaire n'était pas homogène (formation de glycogène de faible et haut poids moléculaire). Le jeûne réduisait dramatiquement les réserves de glycogène hépatique et changeait la distribution du glycogène dans les différentes fractions. Après l'ingestion de nourriture, les réserves de glycogène étaient rétablies, mais à un rythme différent dans chacune des fractions. Le glycogène de haut poids moléculaire était synthétisé plus rapidement que le glycogène de faible poids moléculaire et ce même après une période prolongée d'exposition à la nourriture suite au jeûne (17). Dans les deux tissus (foie et muscle) les fractions de glycogène (cytosolique et lysosomale) interagissaient donc différemment. Ces études ont démontré que dans le foie et dans le muscle, le glycogène de haut poids moléculaire est situé dans les compartiments lysosomaux. De plus, dans le muscle cette fraction lysosomale semble inactive après alimentation suite à une période de jeûne.

## 2.2 LYOGLYCOGÈNE ET DESMOGLYCOGÈNE

Outre le contenu en protéines, des équipes ont démontré que les fractions de glycogène pouvaient être séparées par leurs différences de solubilité. En effet, il a été démontré que seulement une portion du glycogène était soluble dans l'eau chaude tandis que l'autre partie demeurait insoluble et ce, même après 21 jours (60). La portion insoluble fut longtemps considérée comme celle liée à des protéines telles la glycogène synthétase, la glycogène phosphorylase et les enzymes de débranchement et de branchement. La fraction soluble fut pour sa part considérée comme libre de toute liaison avec des protéines cellulaires. En 1934, Willstätter et Rohdewald (81) introduisirent le terme **desmoglycogène** pour la forme de glycogène insoluble dans l'eau chaude ou l'acide et **lyoglycogène** pour la forme soluble. Dans le foie, ces deux fractions ne sont pas présentes en quantités égales (70). Leurs proportions respectives dépendent en fait de l'état physiologique dans lequel se trouve le sujet au

moment du prélèvement. Par exemple, chez l'animal nourri, la majeure partie du glycogène hépatique est retrouvée sous forme de lyoglycogène tandis que la forme desmoglycogène prédomine chez l'animal privé de nourriture (70).

La proportion de chacune des fractions dépend aussi du type de tissu, le muscle squelettique contenant plus de desmoglycogène que de lyoglycogène (12). Au niveau cardiaque, 50 % du glycogène se trouve sous forme de desmoglycogène (6). Par contre, dans le foie, peu de desmoglycogène est présent (15). Au niveau musculaire, une interconversion entre les deux fractions lyo- et desmo- a été répertoriée. En effet, la conversion lyoglycogène vers desmoglycogène a été démontrée en cas de jeûne, d'injection d'adrénaline, d'insuline, de thyroxine, d'adrénalectomie, d'hypophysectomie et de travail musculaire (64).

En 1960, Stetten et Stetten (74), ont reconnu différents types d'association entre le glycogène et les protéines cellulaires. D'après les travaux de cette équipe, le glycogène doit être associé aux enzymes impliquées dans son métabolisme ainsi qu'à des composantes cellulaires (réticulum endoplasmique et filaments intermédiaires) pour être actif (66, 67, 68).

**TABLEAU 2.1**  
**Représentation des diverses fractions du glycogène**

Auteurs	Glycogène	Distinction basée sur...	Nomenclature
Willstätter (1934)	Musculaire Leucocytaire	Différence de solubilité	lyo-, desmo- glycogène
Geddes & Calder (1977, 1989, 1992)	hépatique de lapin musculaire de rat	Poids moléculaire	cytosolique lysosomal
Lomako (1985)	musculaire de lapin	Ratio protéine: glucose	pro-, macro- glycogène
Rybicka (1977) (1979)	cardiaque du chien	Composition en protéines des glycosomes	lyo-, desmo- glycosomes

## 2.3 GLYCOSOMES

### 2.3.1 La notion de glycosome

Dès ses premiers travaux, Bernard (11) suspectait une association du glycogène à des protéines, en l'occurrence des enzymes capables de dégrader le glycogène et ce même *post-mortem*. Comme l'étude de l'activité enzymatique était faite sur des fractions isolées de glycogène hépatique, la réalité de l'association d'enzymes au glycogène a longtemps été mise en doute. S'agissait-il bien d'enzymes ou simplement d'artefacts provenant de l'extraction? Ces doutes ont été levés grâce à l'utilisation de méthodes d'extraction drastiques telles le traitement avec le potassium chaud, l'acide trichloroacétique (TCA) ou l'eau bouillante suivies d'une précipitation par l'alcool ou par des acides (70). En 1942 (46), Lazarow, considérant l'existence de particules microscopiques de glycogène nota que même en faible quantité, des protéines étaient indispensables au maintien du glycogène sous forme de particules. Ce dernier observa également que les agents dispersant les particules de glycogène dénaturaient les protéines sans toutefois affecter le glycogène lui-même (46).

Parmi les enzymes associées avec le glycogène, la glycogène phosphorylase (GP) a été isolée et étudiée pour la première fois par Cori *et al.* dans les années 1930 (21). Par la suite, la glycogène synthétase (GS) a été identifiée par Leloir et Goldemberg (48). D'autres enzymes telles que les enzymes de branchement et de débranchement, les protéines phosphatases et les protéines kinases sont aussi associées au glycogène (70). L'association glycogène-protéines est donc une unité fonctionnelle spécifique de la cellule et non pas un artefact (57). L'identification d'enzymes impliquées dans le métabolisme du

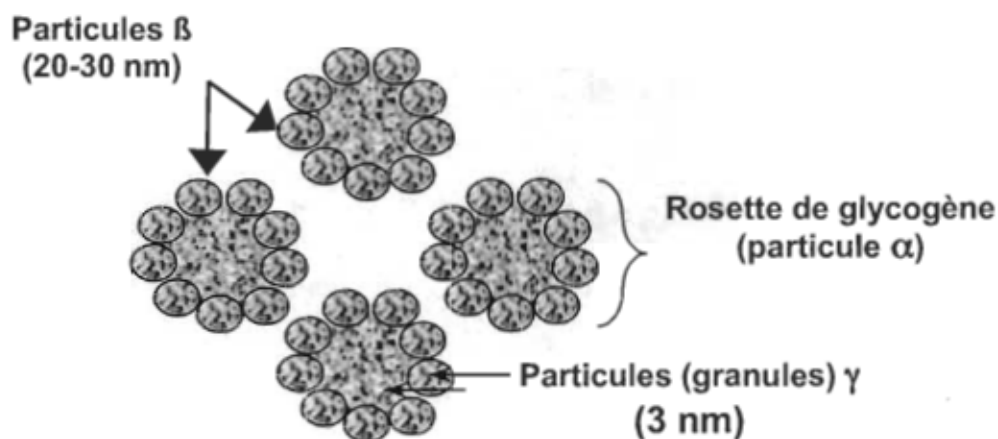
glycogène continue encore aujourd'hui. En fait, les dernières découvertes ont permis de démontrer que le métabolisme du glycogène n'est pas seulement régulé par la glycogène phosphorylase (GP) et la glycogène synthétase (GS), mais aussi par une famille de sous-unités de la protéine phosphatase-1, appelée "sous-unités ciblant le glycogène" (*glycogen-targeting subunits*) (29).

Au niveau de la nomenclature, Scott et Still (71) introduisaient la notion de glycosome, une structure complexe et dynamique associant le glycogène à des protéines. Les analyses biochimiques (57) et structurales (67) par microscopie électronique ont permis de confirmer la présence dans les cellules musculaires et hépatiques de ces complexes fonctionnellement indépendants liant intimement le glycogène à ces protéines (57).

### 2.3.2 Association enzymes-glycogène

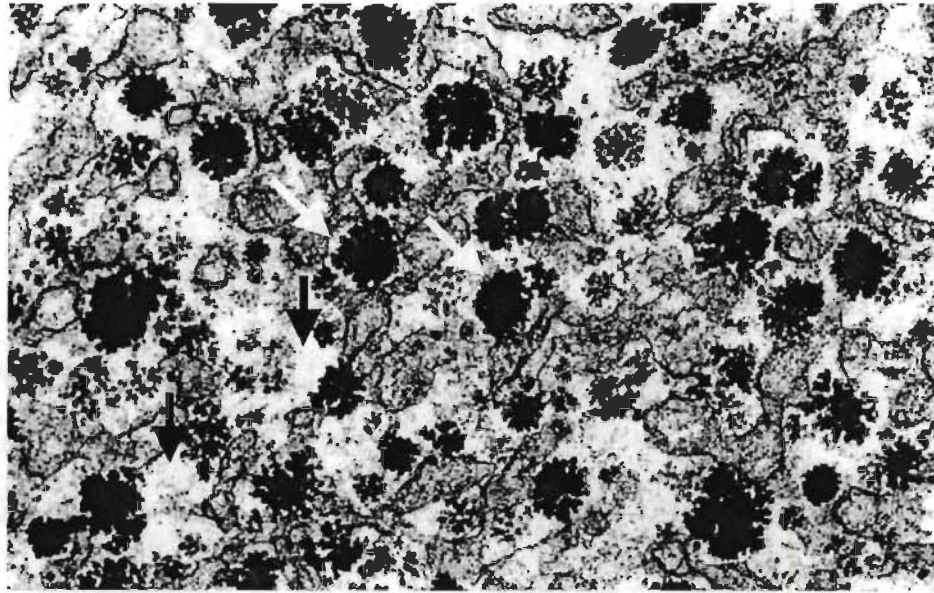
Par des études en microscopie électronique sur des fibres cardiaques de chien, Rybicka a confirmé l'association entre le glycogène et les enzymes de son métabolisme, formant des organelles, les glycosomes. Ces derniers peuvent être liés à des structures intracellulaires (comme le réticulum endoplasmique) formant ainsi des complexes appelés desmoglycosomes (desmoglycogène associé à des protéines). (70). En 1962, Drochmans (21) a étudié par microscopie électronique des coupes de foie avec une technique de coloration négative. Drochmans observa alors 3 types de particules de glycogène: les particules  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Les particules  $\alpha$  représentaient des rosettes typiques retrouvées dans le foie tandis que les particules  $\beta$  étaient des sous-unités sphériques des rosettes  $\alpha$  mesurant environ 20-30 nm. Les particules  $\gamma$  correspondaient quant à elles à des sous-unités des particules  $\alpha$  et  $\beta$  d'environ 3 nm (figure 2.1).

La plupart des techniques de microscopie électronique utilisent des colorations à l'uranyl/plomb (U/Pb). Ces colorations permettent de visualiser les particules  $\alpha$  et  $\beta$  (70). Cependant, ce type de colorant ne fixe que les liaisons ioniques et le glycogène étant un polymère de glucose, il forme des liens covalents et ne peut pas être visible avec de telles techniques (70). Le glycogène en lui-même ne peut pas être coloré par des métaux lourds, mais peut être visualisé par une réaction cytochimique similaire à la technique d'acide périodique de Schiff (*PA-Schiff reagent*) utilisée pour la microscopie conventionnelle. Quand le tissu est préalablement traité à l'acétate d'uranyl, les protéines sont séparées du glycogène et solubilisées. Le glycogène restant forme alors des agrégats. Comme le glycogène ne se colore pas avec les techniques régulières de microscopie électronique, ces agrégats se présentent sous forme de zones non colorées (figure 2.2) (13).



**FIGURE 2.1:** Schéma illustrant des rosettes de glycogène avec particules  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ .





**FIGURE 2.2: Rosettes de glycogène (particules  $\alpha$ , flèches blanches) et glycogène (zones non-colorées; flèches noires). Adaptée de: *Electron Microscopy Principles and Techniques for Biologist* (13).**

En 1977 et 1979 Rybicka *et al.* (67, 68, 69) ont étudié chez le chien le glycogène des fibres cardiaques traitées avec de l'acétate d'uranyl. Les sections marquées avec cet agent montraient des particules sphériques de 20-30 nm tandis que les sections colorées histologiquement montraient des particules de 3 nm agrégées à l'intérieur des particules  $\beta$  de 20-30 nm. Comme l'association de protéines au glycogène avait été bien identifiée par Leloir et Goldemberg (48) et Meyer *et al.* (57), il est apparu que le marquage obtenu par l'acétate d'uranyl correspondait aux protéines glycogéniques (70). Les glycosomes sont formés de protéines solubles (64). L'adsorption de ces dernières sur le glycogène les rend insolubles. Cependant, un traitement à pH acide (par exemple l'acétate d'uranyl ou l'acide trichloroacétique) induit la dissociation du glycogène des protéines le rendant ainsi soluble. La disparition des particules de 3 nm dans les tissus traités à l'acétate d'uranyl s'expliquait

donc par la solubilisation des protéines à pH acide. Les protéines, contrairement au glycogène, peuvent être marquées à l'aide d'acétate d'uranyl et de plomb. Ce dernier peut être visualisé par une coloration histologique négative. Les glycosomes ont une morphologie qui s'apparente aux ribosomes. Chacune de ces structures réagit avec l'acétate d'uranyl, ce qui en fait donc une bonne méthode de coloration permettant de visualiser les protéines associées au glycogène (67).

En 1979 et 1981 Rybicka *et al.* (66, 67, 68) ont démontré que les glycosomes attachés aux membranes cellulaires demeuraient intacts dans les tissus traités à l'acétate d'uranyl tandis que les glycosomes libres dans le cytosol étaient détruits. Les glycosomes résistants à l'acétate d'uranyl correspondent à la portion résistante à l'acide et aux desmoglycogènes observés dans les études biochimiques et portent le nom de desmoglycosomes (70). Les lyoglycosomes représentent la portion libre présente dans le cytosol. Ils sont détruits par les acides (acide trichloroacétique, acétate d'uranyl et acide périodique), les enzymes glycolytiques et protéolytiques (65). La prédominance du marquage des protéines dans les desmoglycosomes résulte de la présence de la glycogène phosphorylase (GP). Particulièrement cette dernière puisqu'elle est riche en groupements thiols (SH) réagissant avec le plomb (37).

L'association des desmoglycosomes aux composantes cellulaires (réticulum endoplasmique et composantes du cytosquelette) leur confère une plus grande stabilité et une plus grande disponibilité afin de fournir du glucose-6-phosphate qui servira, entre autres à fournir le glucose en cas de demande subite (76). En effet les desmoglycosomes sont résistants aux acides, aux digestions par des enzymes protéolytiques et glycolytiques, procédés qui détruisent les lyoglycosomes (76).

Au niveau de l'activité métabolique des lyo- et desmoglycosomes, aucune évidence directe n'est encore disponible. Néanmoins certaines données sur l'activité métabolique des lyo- et desmoglycogènes existent et s'avèrent transférables aux glycosomes. En étudiant l'incorporation de glucose marqué au  $^{14}\text{C}$ , Stetten *et al.* (75) ont démontré une plus grande incorporation de radioactivité dans le glycogène du desmoglycogène que dans le lyoglycogène. Ceci leur permet de suggérer une plus grande activité métabolique dans le desmoglycogène que dans le lyoglycogène. Calder *et al.* (16) ont observé que le glycogène du desmoglycogène musculaire était partiellement dégradé et que ses chaînes extérieures étaient plus courtes que celles du lyoglycogène. Ces observations laissent suggérer une activité importante de la glycogène phosphorylase dans le desmoglycogène et supportent les observations de Stetten *et al.* (75). Au niveau des desmoglycosomes, ces résultats suggèrent que le glycogène contenu dans les desmoglycosomes puisse être métaboliquement plus actif. À l'inverse, Tata *et al.* (76) rapportaient que les desmoglycosomes (liés aux composantes cellulaires) musculaires semblent plus résistants aux injections d'adrénaline et aux stimulations électriques. Les stimulations électriques et adrénergiques sont deux processus associés une glycogénolyse complète dans les lyoglycosomes (non liés aux composantes cellulaires) (76).

## 2.4 PROGLYCOGÈNE ET MACROGLYCOGÈNE

En 1985, Lomako *et al.* (40) ont démontré que le glycogène musculaire du lapin contenait une protéine qui était liée de façon covalente au glycogène, la glycogénine (37 kDa). Cette protéine, qui s'apparente à celle identifiée au préalable par Krisman et Barengo (43), serait à l'origine de la synthèse du glycogène. En plus de la glycogénine, une forme non liée de la glycogénine

possédant des propriétés autocatalytiques a été identifiée dans des extraits musculaires (50). Cette protéine non liée, aux propriétés autocatalytiques, n'est pas toujours présente dans les extraits de muscles frais. Lorsque l'activité de glycosylation était immédiatement étudiée sur un extrait musculaire, elle s'avérait presque indétectable. Cette absence d'activité résultait de la présence d'un inhibiteur de faible poids moléculaire encore inconnu (49). Cet inhibiteur pouvait être soustrait par filtration sur gel permettant ainsi à l'extrait filtré d'être rapidement glycosylé. Cependant, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE) et autoradiographie, la protéine glycosylée ne correspondait pas à celle attendue de 37 kDa, mais plutôt à une autre de plus haut poids moléculaire (400 kDa). Dans la même étude (49) Lomako a démontré une similitude entre la p400 et le glycogène. Ces résultats inédits permirent de conclure que la différence majeure entre la protéine de 37 kDa et celle de 400 kDa était le contenu en glucose. De cette étude, ce groupe conclut qu'il existe en fait deux formes de glycogène différenciables par leur rapport protéines:glucose et non par la présence ou l'absence de protéines qui leur seraient associées. L'une de ces formes ( $1,62 \times 10^6$  kDa) est connue comme étant la macromolécule de glycogène (macroglycogène) contenant 0,35% de protéines. L'autre est une molécule dans laquelle la concentration de protéines est beaucoup plus élevée, soit environ 10%, ce qui expliquerait qu'elle demeure insoluble dans l'acide trichloroacétique (TCA). Comme la p400 peut être transformée en glycogène, elle a été nommée proglycogène (400 kDa).

## 2.5 AVANCÉES RÉCENTES

Certains groupes utilisent encore aujourd'hui la technique d'extraction à l'acide pour séparer les différentes fractions de glycogène selon leur contenu en protéines. Ces mêmes groupes utilisent une nomenclature faisant référence au poids moléculaire (1, 4, 33, 50). Selon ces auteurs, le proglycogène (400 kDa)

correspond à la fraction résistante à l'acide du glycogène et le macroglycogène ( $1,62 \times 10^6$  kDa) correspond à la fraction soluble dans l'acide (1, 4, 32, 49). Cependant, une étude récente du groupe de Hansen *et al.* (36) a suscité une interrogation. Cette étude visait à évaluer si la quantité ou l'activité de la glycogénine devenait un facteur déterminant dans l'atteinte du niveau maximum de glycogène dans le muscle squelettique de rat. Selon la théorie proposée par Alonso *et al.* (4) le glycogène existe sous diverses formes entre le proglycogène et le macroglycogène. De plus, toujours selon Alonso *et al.* (4), le proglycogène correspond à un intermédiaire stable conduisant à la formation du macroglycogène et ne semble jamais dégradé jusqu'au niveau de la glycogénine. Cependant l'étude de Hansen *et al.* a démontré que le nombre de molécules de glycogénine demeurerait constant, ce qui implique que la taille des molécules de proglycogène augmente avec la quantité de glycogène (36). À ce stade, il nous est donc permis de penser que le proglycogène n'est pas une fraction distincte du glycogène. De même, au niveau technique, ceci laisse supposer que la séparation par l'acide isole des glycosomes de tailles différentes selon leur attachement (desmoglycosomes) ou non (lyoglycosomes) aux composantes intracellulaires. La notion de pro- et macroglycogène fait donc référence au type de glycogène qui serait retrouvé dans les différents glycosomes (desmo- et lyoglycosomes). À la lumière des informations présentées dans les sections précédentes, une oscillation entre le proglycogène et le macroglycogène présent dans chacune des fractions est suggérée (figure 2.3).

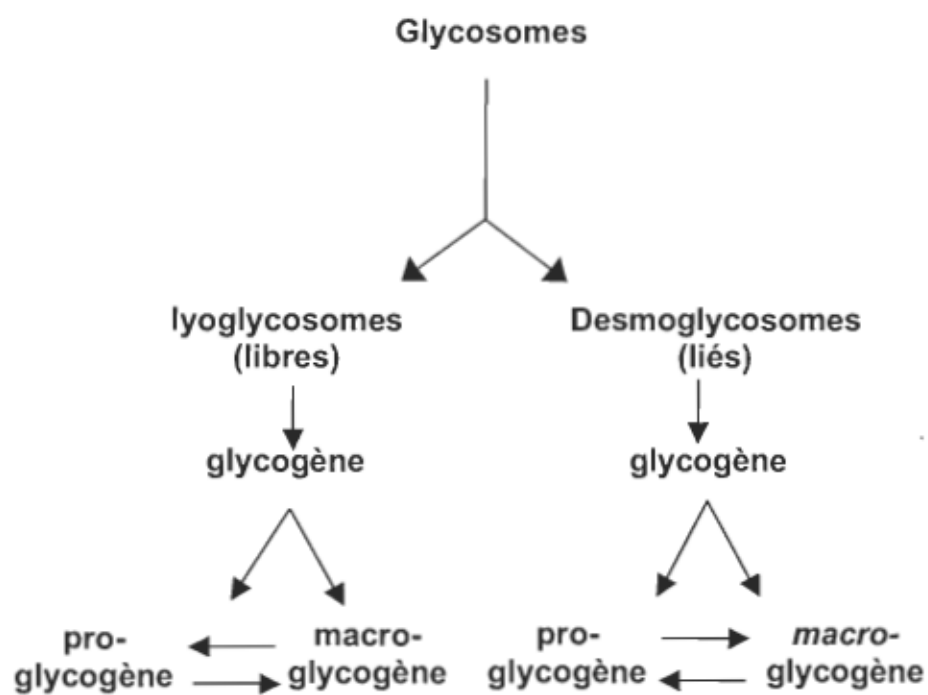


FIGURE 2.3: Arrangement des glycosomes

## CHAPITRE 3

### MODIFICATIONS DES RÉSERVES DE GLYCOGÈNE

#### 3.1 EFFET DE L'EXERCICE AIGU ET CHRONIQUE

##### 3.1.1 Modifications du glycogène musculaire

Différents états physiologiques tels le jeûne et l'exercice aigu ou chronique (entraînement en endurance) sont associés à des modifications au niveau des réserves de glycogène tant hépatique que musculaire.

Le métabolisme du glycogène musculaire a fait l'objet depuis plusieurs années de nombreuses études (3, 20, 31). La glycogénolyse musculaire varie lors de l'exercice: elle augmente avec l'intensité de l'exercice et diminue avec la durée de l'activité physique (8, 9, 24). Une session intense d'exercice suivie d'une diète riche en glucides se traduit par une augmentation du contenu musculaire en glycogène bien au-delà du niveau observé en conditions normales (10). Ce phénomène appelé surcompensation était généralement attribué à une activation de la glycogène synthétase et à une augmentation de la sensibilité des muscles à l'insuline suite à l'exercice (58). L'étude de Greiwe J.S. *et al.* (33) infirme cette hypothèse. Dans cette étude, ce groupe n'a pas observé d'augmentation de l'activité de la glycogène synthétase. Cependant une augmentation du contenu musculaire d'une des isoformes des transporteurs de glucose, GLUT-4, en réponse à un entraînement en endurance a été démontrée. Cette modification des transporteurs de glucose serait responsable: 1) d'une accumulation importante de glycogène après l'effort et 2) d'une



surcompensation du glycogène musculaire suite à l'ingestion de glucides en post-exercice.

En plus des réserves de glycogène musculaire, les quantités relatives des différentes fractions du glycogène sont aussi affectées par l'entraînement. Hansen B.F. *et al.* (36) ont observé chez des rats soumis à un entraînement à la nage que le macroglycogène représentait en fait une faible portion du glycogène musculaire total et qu'un grand nombre de particules de glycogène étaient incomplètes, et ce, même en présence d'une concentration élevée de glycogène. Cette même étude permis de démontrer que la fraction proglycogène, définie comme un intermédiaire stable (section 2.6), augmentait en fait avec la quantité de glycogène; le proglycogène ne représenterait donc pas une fraction distincte du glycogène. Ceci laisse supposer qu'il pourrait être présent dans deux compartiments (glycosomes) différents. Graham *et al.* (32) ont aussi étudié chez l'Homme, à l'aide de biopsies musculaires, l'effet de l'intensité et de la durée de l'exercice sur le catabolisme des deux fractions de glycogène. Dans cette étude plusieurs changements dans la fraction proglycogène ont été observés: l'exercice induisait une diminution importante du proglycogène et la glycogénolyse était plus importante. Ces résultats ont permis de conclure que les deux fractions de glycogène étaient métabolisées différemment pendant l'exercice.

### 3.1.2 Modifications du glycogène hépatique

L'effet de l'entraînement en endurance sur les réserves de glycogène hépatique a aussi été étudié. Certains auteurs dont Adams *et al.* (2), Baldwin *et al.* (5), Galbo *et al.* (27) et Kirwan *et al.* (41) ont observé que l'entraînement en endurance était associé à une augmentation du contenu hépatique en



glycogène. En contrepartie, Fitts *et al.* (25) et James *et al.* (39) n'ont pas observé de changement du contenu du foie en glycogène suite à un entraînement en endurance (tableau 4.1). Ces résultats contradictoires pourraient être attribués au type d'entraînement, à l'intensité de l'entraînement ou, comme suggéré par Baldwin (5), aux différents régimes alimentaires des animaux entraînés.

**TABEAU 3.1**  
**Revue de l'effet de l'entraînement sur les réserves de glycogène**  
**hépatique**

Auteurs	Modèle	Entraînement	Résultats ( <i>Entraînés</i> <i>vs Sédentaires</i> )
Adams <i>et al.</i> (1989)	Rats	Exercice sur tapis roulant (1h)	25-30 % plus de glycogène hépatique chez les entraînés
Baldwin <i>et al.</i> (1975)	Rats	Entraînement en endurance à la nage (6h/jours, 14 semaines)	Réserves de glycogène supérieures chez les entraînés et utilisées moins rapidement
Galbo <i>et al.</i> (1979)	Rats	Entraînement en endurance à la nage (6h/jours, 8 semaines)	35 % d'augmentation du contenu hépatique en glycogène
Kirwan <i>et al.</i> (1990)	Rats	Entraînement sur tapis roulant (5jours/semaine, 9 semaines)	48 % d'augmentation du contenu hépatique en glycogène
Fitts <i>et al.</i> (1975)	Rats	Entraînement sur tapis roulant (5jours/semaine, 13 semaines)	Aucune différence du contenu hépatique en glycogène entre entraînés et sédentaires
James <i>et al.</i> (1984)	Rats	Entraînement sur tapis roulant avec différentes charges	Aucune différence du contenu hépatique en glycogène entre entraînés et sédentaires

### 3.2 OBJECTIFS

Nous savons présentement que 1) l'entraînement en endurance ne modifie pas la quantité des réserves de glycogène hépatique (2, 5, 22, 25, 27, 39, 41), 2) la glycogène phosphorylase n'est pas affectée par l'entraînement (23) et 3) la réponse de la glycogénolyse hépatique est plus importante chez les sujets entraînés que les sujets sédentaires sous stimulation au glucagon (22, 23). Par contre, aucune donnée n'existe en ce qui concerne l'effet de l'entraînement en endurance sur les modifications du contenu hépatique en glycogène associé aux lyo- ou desmoglycosomes ainsi que sur la structure même du glycogène selon le récent modèle établi par Meléndez (figure 1.4 (55)). De nombreuses questions restent encore sans réponse et ont orienté la présente étude.

Ce travail avait pour but de documenter l'effet de l'entraînement en endurance sur la structure du glycogène hépatique et d'évaluer le contenu en glycogène des différents glycosomes chez le rat sain sédentaire ou entraîné (8 semaines de nage, 3 heures/jour, 5 jours/semaine).

Pour isoler le glycogène deux types de technique sont proposées dans la littérature: méthode enzymatique (1) ou chimique (72). Dans le présent projet, pour déterminer le degré de branchement, le glycogène a été purifié par digestion avec de l'hydroxyde de potassium et soumis à une oxydation au périodate permettant de libérer de l'acide formique. L'acide formique ainsi formé provient des extrémités non-réductrices dont le nombre est égal au nombre de molécules de glucoses branchées (72). Finalement, nous avons pu à partir du modèle mathématique et des formules proposées par Meléndez *et al.* (55) calculer les différents paramètres structuraux du glycogène chez les animaux entraînés et sédentaires. Dans un deuxième temps, les deux types de

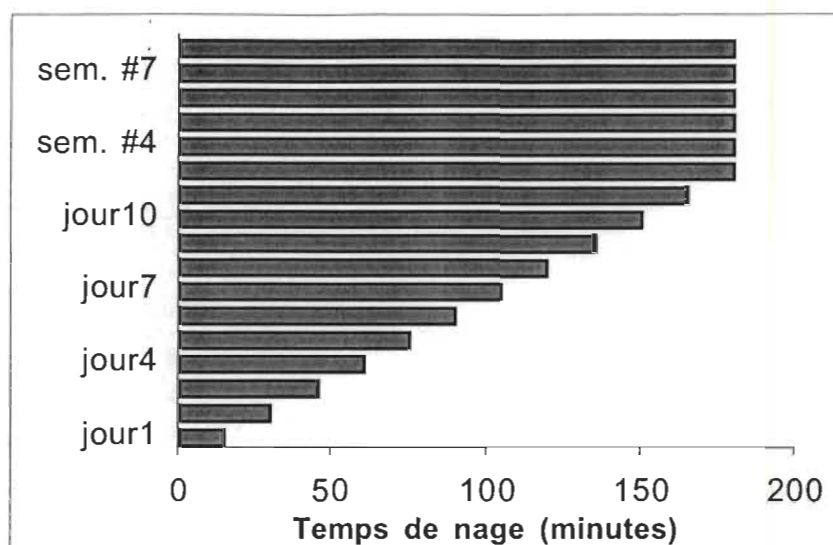
glycosomes ont été séparés par leur différence de solubilité à l'acide trichloroacétique, les lyoglycosomes étant solubles dans l'acide et les desmoglycosomes résistant à l'acide.

## **CHAPITRE 4**

### **MÉTHODOLOGIE**

#### **4.1 PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL**

Les expériences présentées dans ce travail ont été réalisées avec des rats mâles de l'espèce Sprague-Dawley. Les rats ont été placés dans des cages individuelles dans une pièce dont la température était maintenue à 20°C avec une humidité relative de 55%. Les animaux ont été soumis à un cycle de 12 heures de jour et 12 heures de nuit et avaient libre accès à l'eau et la nourriture. Les animaux ont été assignés au hasard à un groupe non-entraînés (n=10) ou entraînés (n=13). Les rats du groupe entraînés ont été soumis à un programme d'entraînement à la nage dans des bassins de 60 x 90 cm contenant une hauteur de 50 cm d'eau à 37°C (47). L'acclimatation s'est faite de façon progressive à raison de 15, 30, 45, 60, 75 minutes pour la première semaine et de 120, 135, 150, 165, 180 minutes pour la deuxième semaine (figure 4.1). Par la suite l'exercice a été maintenu à 3 heures par jour (8:00 à 11:00), 5 jours par semaine et ce pour les 6 semaines suivantes, pour un total de 8 semaines d'entraînement.



**FIGURE 4.1: Programme d'entraînement à la nage**

Quarante-huit heures après leur dernière séance d'exercice les animaux ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (50 mg/Kg de poids). Le foie ainsi que le *rectus femoris* ont été rapidement prélevés et congelés dans l'azote liquide. Ces tissus ont été conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les animaux ont alors été sacrifiés par rupture de l'aorte.

## 4.2 ANALYSES

### 4.2.1 Citrate synthétase

Afin de valider l'efficacité du programme d'entraînement, l'activité de la citrate synthétase, enzyme clé du cycle de Krebs, a été déterminée dans le *rectus femoris* (73). Les échantillons de muscle utilisés pour ce dosage ont été homogénéisés dans un tampon phosphate (0,17 M, pH 7,4) contenant 0,5% d'albumine bovine commerciale (Sigma-Aldrich Canada, Ontario, Canada). Les homogénats ont été soumis à une série de cycles de congélation-décongélation

(3 cycles) afin de libérer l'enzyme contenue à l'intérieur des mitochondries. L'activité maximale a été déterminée par couplage chimique du CoA-SH (libéré par l'acétyl-coenzyme A dans le cycle du citrate) au 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoate) (DNTB) (Sigma-Aldrich Canada, Ontario, Canada). La réaction a été initiée par l'addition d'oxaloacétate et la libération de l'ion mercaptide a été mesurée par spectrophotométrie à 412 nm.

#### **4.2.2 Étude du glycogène**

##### **4.2.2.1 Purification du glycogène**

Des morceaux de foie congelés ont été réduits en poudre et digérés dans de l'hydroxyde de potassium (Fisher Scientific, Ontario, Canada). Par la suite le glycogène a été précipité avec de l'éthanol pur (Commercial Alcohols Inc, Ontario, Canada) et froid pour être conservé à -20°C pendant 12 heures. Les échantillons ont été centrifugés (3 000 g, 15 minutes) et seul le culot a été conservé. Ce dernier a alors été dissout dans de l'eau bouillante et reprécipité pendant 12 heures comme précédemment. Le culot a été resuspendu dans de l'eau distillée. Le contenu en glycogène des échantillons ainsi que le degré de branchement de ce dernier ont été mesurés.

##### **4.2.2.2 Contenu en glycogène**

Le contenu en glycogène des échantillons purifiés a été déterminé par hydrolyse acide (60): 100 µl d'acide chlorhydrique (HCl 1 M, Fisher Scientific, Ontario, Canada) ont été ajoutés à 100 µl d'échantillon. Les tubes ont été

pesés, fermés non-hermétiquement et placés dans un bain d'eau à 100°C pendant 4 heures. Par la suite, les tubes ont été pesés de nouveau et les variations de poids ont été corrigées, si nécessaire, par l'ajout d'eau distillée. Les échantillons ont alors été neutralisés à l'aide de Tris base 2 M (Sigma-Aldrich Canada, Ontario, Canada), mélangés et centrifugés (3 000 g, 5 minutes). Le glucose contenu dans les différentes fractions a alors été mesuré par la technique d'hexokinase/glucose-6-phosphate avec essai commercial (Sigma-Aldrich). Dans cette technique, l'hexokinase catalyse la phosphorylation du glucose par l'adénosine triphosphate (ATP), formant ainsi du glucose-6-phosphate et de l'ADP. Le glucose-6-phosphate est alors oxydé en 6-phosphogluconate en présence d'adénine nicotinamide dinucléotide (NAD) sous l'action de la glucose-6-phosphate déshydrogénase. Au cours de cette oxydation, le NAD est réduit en NADH. L'augmentation de la densité optique mesurée à 340 nm est directement proportionnelle à la concentration de glucose présente dans les échantillons. La concentration de glucose totale a été obtenue en additionnant les concentrations de glucose obtenues du glycogène contenu dans les deux fractions de glycosomes (section 4.2.3).

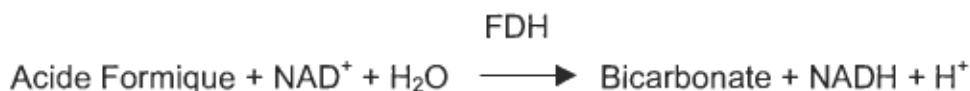
#### 4.2.2.3 Structure du glycogène

La structure de la molécule de glycogène a été déterminée par une oxydation au périodate (Sigma-Aldrich Canada, Ontario, Canada) du glycogène selon le protocole décrit par Serafini et Alemany (72). Le poids moléculaire du glycogène n'étant pas bien défini (entre  $1,62 \times 10^6$  et  $1 \times 10^7$ ), les valeurs suivantes ont été utilisées: poids moléculaire de  $1,62 \times 10^6$  g pour le glycogène ( $10^4$  résidus glucose/molécule) (72) et un degré de branchement de deux (55). L'oxydation entraîne la formation de molécules d'acide formique provenant des extrémités non-réductrices de la molécule. Selon Serafini et Alemany (72), 1 mmole d'acide formique est formée pour 1 mmole de glucose provenant des



extrémités non réductrices. A l'aide de ce ratio 1:1 le nombre d'extrémités non réductrices ( $n$ ; unités glucose) d'une molécule de glycogène contenant  $10^4$  unités glucose est égale à:  $n = [(extrémités\ non-réductrices\ (mmol/L) \cdot 10\ 000) / contenu\ total\ de\ glucoses\ dans\ la\ molécule\ de\ glycogène]$ .

Pour ce faire, 100  $\mu$ l de métapériodate de sodium 0,35 M (Sigma-Aldrich Canada, Ontario, Canada) ont été ajoutés à 50  $\mu$ l de glycogène purifié. Après agitation, les tubes ont été incubés à l'obscurité pendant 24 heures. L'excès de métapériodate a alors été neutralisé par l'ajout d'éthylène glycol (Sigma-Aldrich Canada, Ontario, Canada). L'acide formique (mmol/L) formé au cours de la réaction est ensuite mesuré par une méthode enzymatique utilisant l'acide formique déhydrogénase (FDH) (Xygen Diagnostic, Ontario, Canada). Lors de ce dosage, l'acide formique est oxydé par le NAD en présence de formate déhydrogénase. La quantité de NADH libérée est égale à la quantité d'acide formique formée.



La quantification de l'acide formique généré au cours de l'oxydation permet donc d'identifier la quantité de glucose impliquée dans les branchements. Le nombre de liens alpha 1-6 contenu dans le dernier niveau de la molécule de glycogène est égal à  $N = n/2$ . Le nombre de branchements dans une molécule de glycogène est quant à lui égal à  $N + N/2 + N/4 + N/8 \dots + N/N$ , ce qui équivaut à  $2N - 1$ . Finalement, le pourcentage de branchement est équivalent à:  $[(2N - 1) / 10^4] \times 100$  (55).

Le nombre de chaînes extérieures, dites chaînes A ( $C_A$ ), le nombre total de résidus glucose dans la molécule de glycogène ( $C_T$ ), le nombre de résidus directement disponibles pour la glycogène phosphorylase ( $G_{PT}$ ), le rayon ( $R$ ) ainsi que le volume ( $V_S$ ), de la molécule ont été calculés selon les équations suivantes de Meléndez *et al.*:

$$1) C_A = r^{(t-1)}$$

$$2) G_T = g_c \cdot (1-r^t) / 1-r, \text{ où } g_c = \text{la longueur de chaînes}$$

$$4) G_{pt} = C_A \cdot (g_c - 4), \text{ où } 4 = \text{espace minimum pour la phosphorylase}$$

$$5) V_s = 4/3 \pi \cdot t^3 \cdot (0,12g_c + 0,35)^3$$

Pour tous ces calculs, un degré de branchement égal à deux a été considéré en accord avec le modèle de Whelan (34) ainsi qu'un poids moléculaire pour le glycogène de  $1,62 \times 10^6$ .

#### 4.2.3 Compartimentation du glycogène: lyo- et desmoglycosomes

Les lyoglycosomes (solubles dans l'acide) ainsi que les desmoglycosomes (insolubles dans l'acide) ont été séparés grâce à cette différence de solubilité. La méthode utilisée pour déterminer le contenu en glycogène des fractions lyo- et desmoglycosomes a été adaptée de celle décrite par Alonzo *et al.* (4, 49, 50). Tout d'abord, environ 100 mg de foie ont été lyophilisés. De ces 100 mg, 3 mg ont été pesés dans des tubes de Pyrex (13 x 100 mm). 200 µl d'acide perchlorique (PCA, 1,5 M) (Fisher Scientific, Ontario, Canada) froid ont été ajoutés dans chaque tube, et le tissu a été homogénéisé à l'aide d'une tige de verre afin de l'exposer à l'acide. Après une incubation de 20 minutes sur glace, les échantillons ont été centrifugés à 4°C, 3 000 g pendant 15 minutes. 100 µl

de surnageant ont été prélevés. Ce surnageant représente la fraction de glycogène associée aux lyoglycosomes. Le culot a été utilisé pour mesurer la fraction de glycogène associée aux desmoglycosomes. Un millilitre d'acide chlorhydrique (HCl, 1 M) a été ajouté à chacune des fractions. La fraction lyo- a été simplement mélangée tandis que le culot a été homogénéisé à l'aide d'une tige de verre. Les tubes ont été pesés, fermés non hermétiquement et placés dans un bain d'eau bouillante pendant 2 heures. Par la suite, les tubes ont été pesés à nouveau et les variations de poids ont été corrigées, lorsque nécessaire, par ajout d'eau distillée. Les échantillons ont ensuite été neutralisés à l'aide de Tris base 2 M (Sigma-Aldrich Canada, Ontario, Canada), agités puis centrifugés à 3000 g pendant 5 minutes. La concentration de glucose contenu dans les différentes fractions de glycosomes a alors été mesuré par un test commercial (Sigma–Aldrich) utilisant l'hexokinase/glucose-6-phosphate tel que décrit à la section 4.2.2.2. La concentration totale de glucose a été obtenue en additionnant les concentrations de glucose obtenues dans chacun des glycosomes.

### 4.3 STATISTIQUE

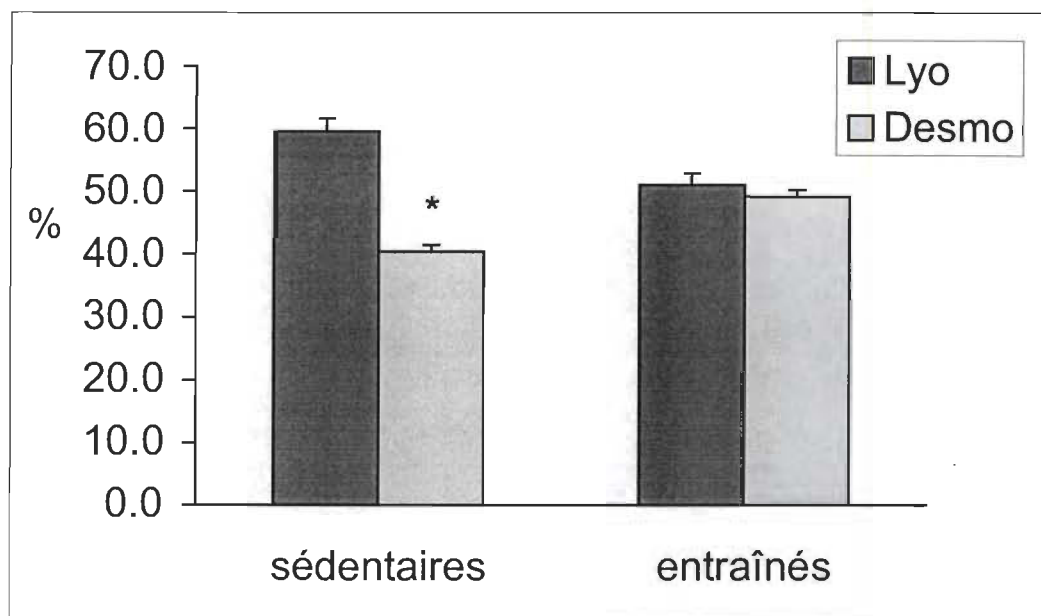
Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne et erreur standard de la moyenne ( $\pm$  SEM). Les différences entre les caractéristiques des deux groupes (sédentaires et entraînés) ont été identifiées à partir du test-t de Student. Un seuil significatif de  $P < 0,05$  a été retenu.

## CHAPITRE 5

### RÉSULTATS

À la fin des 8 semaines d'entraînement, au moment du sacrifice, le poids des animaux sédentaires et entraînés ( $441 \pm 9$  g et  $452 \pm 13$  g chez les sédentaires et les entraînés respectivement) était similaire. Par contre, l'activité de la citrate synthétase dans le *rectus femoris* était de 36% supérieur chez les animaux entraînés ( $27.9 \pm 1.6 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ) comparativement à celle des animaux sédentaires ( $20.5 \pm 12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

Le contenu total en glycogène ainsi que la quantité de glycogène associé aux lyoglycosomes étaient comparables dans les deux groupes, sédentaires et entraînés (tableau 5.1). Cependant, une quantité plus importante de glycogène associé aux desmoglycosomes a été mesurée chez les rats entraînés comparativement aux animaux sédentaires ( $P < 0,05$ ). En effet, 49% du glycogène hépatique des animaux entraînés est retrouvé associé aux desmoglycosomes, comparativement à 40% chez les animaux sédentaires (figure 5.1).



**FIGURE 5.1** Pourcentage du glycogène total présent dans les fractions de glycogène hépatique des animaux sédentaires et entraînés. (\*  $P < 0,05$  vs groupe entraîné)

**TABLEAU 5.1**  
Glycogène total et associé aux lyoglycosomes et desmoglycosomes dans le foie des animaux sédentaires et entraînés.

	Concentration de glycogène hépatique (mM unités glycosyl/Kg de foie sec)	Lyo- (mM unités glycosyl/Kg de foie sec)	Desmo- (mM unités glycosyl/Kg de foie sec)
Sédentaires	921,4 ± 48,3	549,1 ± 44,8	372,4 ± 10,9
Entraînés	972,7 ± 41,2	494,7 ± 20,1	478,0 ± 29,4*

\*  $P < 0,05$  vs au groupe sédentaire

L'entraînement en endurance à la nage chez les rats a aussi eu pour effet d'augmenter la quantité de résidus glucose impliqués dans les branchements (augmentation du % de branchement). Ce même entraînement a causé une diminution du nombre de résidus glucose par chaînes, se traduisant par une augmentation du nombre de niveaux (tableau 5.2). En appliquant les équations proposées par Meléndez *et al.* (55) nous avons obtenu une augmentation du nombre de niveaux et une augmentation de 34% du nombre de chaînes extérieures (chaînes A) dans la molécule de glycogène des rats entraînés. Ces modifications de structure par l'entraînement en endurance engendrent une molécule de glycogène hépatique plus compacte ayant un rayon et un volume réduits de 14% et 33% respectivement (tableau 5.3).

**TABLEAU 5.2**  
**Effet de l'entraînement en endurance sur la structure du glycogène hépatique (partie 1)**

	% de branchement	Longueur de chaîne (unités glucose)	Nombre de niveaux	Unités glucose branchées
Sédentaires	9,2 ± 0,6	11,4 ± 0,5	9,8 ± 0,1	930,0 ± 102,0
Entraînés	12,1 ± 1,1*	8,7 ± 0,9*	10,4 ± 0,2*	1412,0 ± 154,0*

\*  $P < 0,05$  vs groupe sédentaire

**TABLEAU 5.3**  
**Effet de l'entraînement en endurance sur la structure du glycogène hépatique (partie 2)**

	C <sub>A</sub> (unités)	G <sub>PT</sub> (unités)	Rayon (nm)	Volume (nm <sup>3</sup> )
Sédentaires	465 ± 51	3129 ± 116	16,8 ± 0,5	20351 ± 1596
Entraînés	706 ± 77*	2950 ± 309	14,5 ± 1,0*	13538 ± 2853*

- **C<sub>A</sub>** : le nombre de chaînes A
- **G<sub>pt</sub>** : le nombre de résidus accessibles à la phosphorylase.
- \**P* < 0,05 vs groupe sédentaire

**Exemple de calcul:** Soit un échantillon de foie d'un animal du groupe sédentaire dont les concentrations sont les suivantes:

Concentration d'acide formique (mmol/L): 2,56

Contenu total de glucoses (mmol/L): 27,52

$$N = (2,56 \cdot 10000) / 27,52$$

$$= 930,2 \text{ (glucoses branchés)}$$

$$N = 930,2 / 2$$

$$= 465,1 \text{ (C}_A\text{)}$$

$$\% \text{ branchement} = ((2 \cdot 465,1 - 1) / 10000) \cdot 100$$

$$= 9,3$$

$$t = \log(465,2) + 1$$

$$= 9,8$$

$$G_c = 1000^{*-1/1-2^{9,8}}$$

$$= 11,21$$

$$G_{pt} = 465,1 \cdot (11,21 - 4)$$

$$= 3357,2$$

$$V_s = 4/3 \pi \cdot 9,8^3 \cdot (0,12 \cdot 11,21 + 0,35)^3$$

$$= 19199,9$$

$$\mathbf{R} = 9,8(0,12 \cdot 11,21 + 0,35)$$

$$= 16,6$$



## CHAPITRE 6

### DISCUSSION

Les résultats obtenus dans la présente étude démontrent que l'entraînement en endurance: 1) modifie la distribution du glycogène hépatique dans les cellules en augmentant la quantité de glycogène associée aux desmoglycosomes et 2) modifie la structure du glycogène, ce qui se traduit par une diminution de la longueur des chaînes et une augmentation du nombre de branchements. En appliquant les équations de Meléndez (55), une augmentation du nombre de niveaux et de chaînes A ont été observées chez les animaux entraînés. Ces modifications de structure forment une particule de glycogène plus compacte.

La dégradation du glycogène par les enzymes de son métabolisme est un mécanisme complexe qui doit respecter des règles stœchiométriques strictes. La particule de glycogène doit ainsi avoir une structure qui lui permet d'emmagasiner le plus de molécules de glucose possible et ce dans un petit volume. De plus, sous l'action des différentes enzymes, elle doit permettre de libérer très rapidement autant de glucose que nécessaire pour répondre aux besoins d'homéostasie glucidique. Déjà, il y a plus de 40 ans, Stetten *et al.* stipulaient que le métabolisme du glycogène était étroitement lié à sa structure (74). L'absence d'une ou plusieurs enzymes, par exemple l'enzyme de débranchement dans le cas du *glycogen storage disease type III* (80), forme une molécule de structure anormale et engendre donc des perturbations de l'homéostasie glucidique.

Bien que les détails concernant la structure fine du glycogène soient encore méconnus, le modèle de Whelan (34), qui dérive principalement de données obtenues suite à la dégradation enzymatique du glycogène, est le mieux

accepté. La notion d'optimisation de la molécule de glycogène a d'abord été étudiée par Meléndez *et al.* (55) par le biais d'un modèle mathématique (section 1.2.2.4). Le rôle du glycogène étant d'emmagasiner du glucose, il doit pour se faire avoir une structure appropriée. Sa structure branchée lui fournit plusieurs points d'attaque, ou extrémités non-réductrices, pour la glycogène phosphorylase (GP) permettant ainsi de libérer simultanément plusieurs molécules de glucose. Le nombre d'extrémités non-réductrices dans une particule de glycogène est beaucoup plus grand que le nombre de sites pour la phosphorylase. Un nombre élevé d'extrémités non-réductrices augmente donc la capacité de la phosphorylase à se lier au glycogène (55). Considérant une concentration et une activité égales de glycogène phosphorylase et de glycogénine, la molécule de glycogène possédant un grand nombre d'extrémités non-réductrices libérera plus de molécules de glucose. Ce changement équivaut donc à augmenter la concentration de substrat et à maximiser la vitesse de relargage du glucose afin de répondre aux besoins métaboliques.

Pour la première fois, nous avons donc pu déterminer chez des animaux sédentaires et entraînés le pourcentage de branchement de leur glycogène hépatique. Ce pourcentage représente le nombre de glucoses dans la molécule de glycogène qui est directement impliqué dans un branchement. Suite à un entraînement en endurance d'une durée de huit semaines, une augmentation du pourcentage de branchement a été notée. Cette augmentation est associée à une diminution de la taille de la molécule de glycogène. Ces données concordent bien avec l'augmentation de l'activité de l'enzyme de branchement dans le glycogène musculaire observée par Taylor *et al.* (77) chez des animaux entraînés en endurance. Cette observation est la seule donnée disponible à ce jour concernant les changements de la structure du glycogène associés à l'exercice chronique.

Huit semaines d'entraînement en endurance augmentent le nombre de chaînes A, qui sont les plus externes, et ainsi augmentent le nombre potentiel de sites d'attaque pour la phosphorylase. L'optimisation des réserves de glycogène est donc d'une importance capitale. L'entraînement en endurance pourrait contribuer à ces changements. Ces derniers semblent constituer un avantage certain en comparaison avec la structure générale du glycogène chez les animaux sédentaires. De plus, une nouvelle notion fait surface, celle de qualité. En effet, il n'importe pas seulement que le glycogène soit présent en grande quantité mais aussi qu'il puisse être utilisable. La quantité aussi bien que la qualité du glycogène sont donc des facteurs pouvant affecter son utilisation (36).

La compartimentation du glycogène est depuis quelques années un constat nouvellement accepté par le milieu scientifique. En plus des modifications de structure du glycogène, la proportion associée aux desmoglycosomes est aussi modifiée par l'entraînement en endurance. En effet, une augmentation du glycogène associé aux desmoglycosomes (les plus métaboliquement actifs) a été observée. Parallèlement, une diminution du glycogène associé aux lyoglycosomes a été identifiée.

Tel que mentionné précédemment (section 2.3.1), la notion de glycosome a été introduite pour la première fois par Scott et Still (71) et confirmée plus tard à l'aide de la microscopie électronique. Plusieurs auteurs dont Gao K. *et al.* (28), Meyer *et al.* (57), Tata (76) et Wilstätter (81) ont démontré que le glycosome était une unité fonctionnelle indépendante reliée à des protéines cellulaires. Au niveau hépatique, l'association des desmoglycosomes au réticulum endoplasmique lisse et rugueux a été observée par microscopie électronique (51). D'autres études ont permis de démontrer que dans les fibres musculaires

du chien, les desmoglycosomes étaient attachés aux myofibrilles, aux mitochondries, au sarcolemme, à l'appareil de Golgi et aux polyribosomes (66, 67, 68, 69, 70). Cette association à des protéines semble conférer aux desmoglycosomes une plus grande stabilité.

En étudiant la glycogénine, la protéine composant le noyau du glycogène c'est-à-dire l'amorce du glycogène, Alonzo *et al.* (4) et Lomako J.W. *et al.* (49) ont identifié deux formes de glycogène. Ils ont déterminé que l'une d'elles était de faible poids moléculaire (400 kDa) et relativement riche en protéines, le proglycogène (PG). L'autre, de plus haut poids moléculaire, correspondait au glycogène classique ou macroglycogène (MG). Selon ces auteurs, les deux formes diffèrent dans leur ratio protéines:glucose. De plus, comme le PG contient plus de protéines que le MG, il serait insoluble dans l'acide et de cette façon les deux fractions pourraient être séparées. Cependant, les données recueillies dans le présent travail ne vont pas dans le sens de ces dernières observations. Nous supportons plutôt la théorie des glycosomes (permettant l'identification des deux fractions intracellulaires de glycogène) pour les raisons suivantes. Nous avons observé dans le foie une proportion élevée (> 40%) de la fraction insoluble dans l'acide (desmoglycosomes) ce qui est incompatible avec les observations d'Alonso *et al.* (4) pour lesquelles le proglycogène, aussi identifié comme insoluble dans l'acide, correspond à seulement 3% du glycogène hépatique et à une faible concentration de glycogénine (0,35% du poids du foie). Théoriquement, les particules de glycogène ont un poids moléculaire approximativement égal à celui de la glycogénine (36 kDa). La molécule de glycogène complète (particule  $\beta$ ) a un poids moléculaire de  $10^7$  kDa (selon Hansen *et al.* (36)) ce qui suggère que le poids moléculaire de la glycogénine correspond à 0,035% de celui de la particule  $\beta$ , considérant un ratio glycogénine : particule  $\beta$  égale à 1 (36). Le proglycogène n'est donc pas une fraction distincte du glycogène, mais un type de glycogène compris à l'intérieur des glycosomes. Le PG qu'Alonso *et al.* (4) ont isolé correspondrait

en fait aux desmoglycosomes et le MG aux lyoglycosomes identifiés par Rybicka (70).

En utilisant la méthode d'extraction à l'acide permettant de séparer les deux fractions (et non les deux formes) de glycogène, Hansen, FB *et al.* (36), ont récemment remis en question l'hypothèse selon laquelle le proglycogène serait une fraction distincte de la particule de glycogène. Dans le muscle à l'état normal de repos, le ratio pro:macro est égal à 8:1. Considérant un poids moléculaire stable d'environ 400 kDa pour le proglycogène et  $10^7$  kDa pour le macroglycogène, il leur a été possible de calculer que si tout le proglycogène devait être converti en macroglycogène, la quantité de glycogène totale serait environ 600  $\mu\text{mol/g}$  (36). Cependant, cette valeur est 3 à 4 fois plus élevée que la valeur mesurée dans le muscle squelettique de rat (100 à 170  $\mu\text{mol/g}$ ). Ceci permet d'affirmer que le proglycogène, considéré par Alonso *et al.* comme un intermédiaire stable jamais dégradé jusqu'au niveau de la glycogénine, augmente en fait avec la taille de la particule. Le proglycogène ne représenterait donc pas une fraction distincte de la molécule, mais bien une étape dans la formation du macroglycogène qui lui est contenu dans les deux types de glycosomes (desmo- et lyoglycosomes, figure 2.3).

Considérant les faits établis précédemment, nous pensons que l'extraction à l'acide nous permet de séparer non pas le proglycogène du macroglycogène, mais bien les différents glycosomes tel que décrit par Rybicka (70). Par la suite, la seule façon de séparer le proglycogène du macroglycogène serait par électrophorèse selon leur poids moléculaire, tel que suggéré par Lomako *et al.* (49). Le pro- et le macroglycogène ne représenteraient donc pas des fractions séparées du glycogène, mais plutôt un agencement de ces dernières à l'intérieur des différents glycosomes (figure 2.3). De plus, Calder *et al.* (16) ont démontré que l'association du glycogène musculaire aux desmoglycosomes

était métaboliquement plus actif que celui lié aux lyoglycosomes. Ceci s'expliquerait par une plus grande activité de la glycogène phosphorylase dans cette fraction (16). Dans le cas d'un entraînement en endurance, il importe de pouvoir libérer de façon presque immédiate des molécules de glucose afin de subvenir à la demande glucidique (dans le foie) ou énergétique (dans le muscle) accrue. Dans ce cas, les glucoses libérés pourraient provenir des desmoglycosomes, fraction la plus active. Ceci se traduirait alors par une diminution de la longueur des chaînes A dans cette dernière fraction.

De façon générale, l'augmentation de la proportion de glycogène associé aux desmoglycosomes ainsi que les modifications structurales (augmentation du pourcentage de branchement et diminution de la taille de la molécule) observées par notre équipe supportent l'idée d'une augmentation de la disponibilité du glycogène hépatique suite à un entraînement en endurance. Même si l'augmentation de la concentration de glycogène hépatique demeure incertaine avec l'entraînement, ces résultats laissent entrevoir une nouvelle vision du glycogène qui implique aussi les notions de répartition et de structure.

À ce stade, il est donc possible, sous réserve de confirmation, de suggérer une optimisation de la molécule de glycogène avec l'entraînement aux niveaux "intraparticulaire" et "extraparticulaire". Ceci se traduit par la formation d'une particule de glycogène plus compacte (réduction de son volume) ayant un plus grand nombre d'extrémités non-réductrices, augmentant ainsi l'efficacité de la GP. Le glycogène se trouve de plus réparti dans deux fractions (desmo- et lyoglycosomes). Au niveau extraparticulaire, suite à un entraînement en endurance, le glycogène hépatique se retrouve associé en plus grande quantité aux desmoglycosomes identifiés comme métaboliquement plus actifs. Les résultats obtenus dans la présente étude ne nous permettent cependant pas encore de déterminer la structure du glycogène contenu dans chacune des

deux fractions ni d'expliquer les mécanismes responsables de ces changements induits par l'exercice chronique.

Il est bien établi qu'un exercice prolongé d'intensité modérée diminue l'insulinémie, augmente la glucagonémie et les niveaux de cathécolamines (42, 45). Ces réponses hormonales sont affectées par l'entraînement en endurance (22). En fait, l'entraînement en endurance diminue les concentrations plasmatiques du glucagon et des cathécolamines. Malgré un ratio insuline:glucagon plus élevé chez des sujets entraînés, l'homéostasie du glucose est améliorée par une augmentation de la production hépatique de glucose (56). Drouin *et al.* (22) ont mis en évidence, dans une étude chez l'Homme, une augmentation de la sensibilité hépatique au glucagon chez des sujets entraînés se traduisant par une augmentation de la production hépatique de glucose (PHG) suite à une stimulation au glucagon. Dans cette étude, les sujets sédentaires et entraînés ont été étudiés au repos. Les sécrétions endogènes d'insuline et de glucagon ont été supprimées par la somatostatine et remplacées par des infusions constantes afin d'obtenir des concentrations physiologiques similaires dans les deux groupes. Dans ces conditions, cette équipe a observé une augmentation de 53% de la production hépatique de glucose chez les sujets entraînés comparativement aux sujets sédentaires (22). Ces observations ont été confirmées par une étude chez des rats soumis à un entraînement en endurance (23). Utilisant un modèle de perfusion de foie *in situ*, pour une même concentration de glycogène chez les animaux entraînés et sédentaires, une augmentation de la PHG induite par la glycogénolyse ainsi que par la néoglucogenèse a été démontrée sous stimulation par le glucagon (7, 24, 44). Les résultats obtenus chez l'Homme et le rat confirment une augmentation de la sensibilité hépatique au glucagon avec l'entraînement. Les mécanismes responsables de cette augmentation de sensibilité du foie à une stimulation au glucagon observée chez les sujets entraînés restent à être caractérisés. Parmi les mécanismes potentiellement responsables de cette

augmentation de sensibilité se trouve la modulation des récepteurs du glucagon. Légaré *et al.* (47) ont démontré une augmentation du nombre de récepteurs hépatiques du glucagon chez des rats soumis à un programme d'entraînement en endurance à la nage d'une durée de 8 semaines. Parmi les autres mécanismes responsables de cette augmentation de sensibilité du foie à une stimulation au glucagon, la distribution du glycogène dans les lyoglycosomes ou les desmoglycosomes pourrait être responsable d'une meilleure réponse de la glycogénolyse au glucagon.

En conclusion, l'entraînement n'affecte pas uniquement la quantité de glycogène hépatique, mais modifie sa structure fine ainsi que sa répartition intracellulaire. L'effet bénéfique de l'entraînement en endurance sur le métabolisme du glycogène hépatique dépasse donc les seuls facteurs de quantité et d'enzymes. L'entraînement, sans changer la quantité de glycogène, optimise la molécule en 1) rendant la structure plus facilement accessible et 2) favorisant l'emmagasiner du glycogène dans la fraction la plus métaboliquement active.

## **PERSPECTIVES D'AVENIR**

Ce travail ouvre donc la porte à de nouvelles expérimentations afin de poursuivre notre compréhension de la structure du glycogène ainsi que son organisation intracellulaire. Tout d'abord, il s'agira d'identifier à l'aide de la microscopie électronique les deux types de glycosomes (lyo- et desmoglycosomes). Par la suite, il serait intéressant d'utiliser la technique de "pulse-chase" afin de suivre le mouvement et d'étudier la régulation du glycogène dans les fractions lyoglycosomes et desmoglycosomes. Finalement,



à partir du modèle de Meléndez, établir la structure du glycogène présent dans les différents glycosomes.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Adamo KB and Graham TE. Comparison of traditional measurements with macroglycogen and proglycogen analysis of muscle glycogen. *J Appl Physiol* 84: 908-913 (1998).
2. Adams JH and Koeslag JH. Post-exercise ketosis and glycogen content of liver and muscle in rats on high carbohydrate diet. *Eur J Appl Physiol* 59: 189-194 (1989).
3. Ahlborg G, Bergstrom J, Edlund G, and Hultman E. Muscle glycogen and muscle electrolytes during prolonged physical exercise. *Acta Physiol Scand* 70: 129-142 (1967).
4. Alonso MD, Lomako J, Lomako WM and Whelan J. A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J* 9: 1126-1137 (1995).
5. Baldwin KM, Fitts RH, Booth RW, Winder WW and Holloszy J. Depletion of muscle and liver glycogen during exercise. *Plfuegers Arch* 354: 203-212 (1975).
6. Bartley W and Dean B. Extraction and estimation of glycogen and oligosaccharides from rat heart. *Anal Biochem* 25: 99-108 (1968).
7. Beaulieu V, Drouin R, Milot M, Massicotte D, Péronnet F and Lavoie C. Hepatic glucagon sensitivity induced by endurance training: effect mediated by modification in hepatic glycogen structure? *Med. Sci. Sports Exerc.* 32: S224#1071 (2000).
8. Bergstrom J, Guarnieri G and Hultman E. Carbohydrate metabolism and electrolyte changes in human muscle tissue during heavy work. *J Appl Physiol* 30: 122-125 (1971).
9. Bergstrom J, Hermansen L, Hultman E and Saltin B. Diet, muscle glycogen and physical performance. *Acta Physiol Scand* 71: 140-150 (1967).
10. Bergstrom J and Hultman E. Muscle glycogen synthesis after exercise: an enhancing factor localized to the muscle cells in man. *Nature Lond* 210: 309-310 (1966).
11. Bernard CI. Sur le mécanisme physiologique de la formation du sucre dans le foie. *Compt Rend Sci* 44: 578-586 (1857).
12. Bloom WL, Lewis GT, Schumpert MZ and Shen T. Glycogen fraction of liver and muscle. *J Biol Chem* 188: 631-636 (1950).
13. Bozzola JJ and Russell LD. *Electron Microscopy Principles and Techniques for Biologist*. 2e éd Jones and Bartlett Publisher, Sudbury, U.S.A., pp. 564-568 (1992).
14. Bullivant HM, Geddes R and Wills PR. The fine structure of glycogen. *Biochem Int* 6: 497-506 (1983).
15. Buttler NA, Lee EYC and Whelan WJ. A protein-bound glycogen component of rat liver. *Carbohydr Res* 55: 73-82 (1977).
16. Calder PC and Geddes R. Digestion of the protein associated with muscle and liver glycogens. *Carbohydr Res* 148: 173-177 (1986).

17. Calder PC and Geddes R. Heterogeneity of glycogen synthesis upon refeeding following starvation. *Int J Biochem* 24: 71-77 (1992).
18. Calder PC and Geddes R. Rat skeletal muscle lysosomes contain glycogen. *Int J Biochem* 21: 561-7 (1989).
19. Cartee GD and Farrar RP. Exercise training induces glycogen sparing during exercise by old rats. *J Appl Physiol* 64: 259-265 (1988).
20. Conlee S. Muscle glycogen and exercise endurance - a twenty year perspective. *Exercise and Sports Science Review* 15: 1-28 (1987).
21. Drochmans P. Morphologie du glycogène. Etude au microscope électronique de colorations négatives du glycogène particulaire. *J Ultrastruct Res* 6:141-163 (1962).
22. Drouin R, Lavoie C, Bourque J, Ducros F, Poisson D and Chiasson JL. Increased hepatic glucose production response to glucagon in trained subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 274: E23-E28 (1998).
23. Drouin R, Milot M, Robert G, Massicotte D, Péronnet F and Lavoie C. Hepatic glucagon sensitivity induced by endurance training : Effect mediated by increased glycogenolysis. *Med Sci Sports Exerc (résumé)* 32: S224 #1061 (2000).
24. Essen B. Glycogen depletion of different fibre types in humanskeletal muscle during intermittent and continuous exercise. *Acta Physiol Scand* 103: 446-455 (1978).
25. Fitts RH, Booth RW, Winder WW and Holloszy J. Skeletal muscle respiratory capacity, endurance and glycogen utilisation. *Physiol* 228: 1029-1033 (1975).
26. Friden J, Seger J and Ekblom B. Topographical localizationof muscle glycogen: an ultrahistochemical study in the human vastus lateralis. *Scand* 135: 381-391 (1989).
27. Galbo H, Saugmann P and Richter EA. Increase hepatic glycogen synthase and decreased phosphorylase in trained rats. *Scand* 107: 269-272 (1979).
28. Gao K, Cardell EL, Morris RE, Griffin BF and Cardell RR. Hepatic subcellular compartementation of cytoplasmic phosphoenolpyruvate carboxilase determined by immunogold electron microscopy. *J Micr Soc America* 1: 151-161 (1995).
29. Gasa R, Jensen PB, Berman HK, Brady MJ, DePaoli-Roach AA and Newgard CB. Distinctive regulatory and metabolic properties of glycogen-targeting subunits of protein phosphatase-1 (PTG, GL, GM/RGI) expressed in hepatocytes. *J Biol Chem* 275: 26396-403 (2000).
30. Geddes R and Stratton GC. Molecular and metabolic heterogeneity of liver glycogen. *Carbohydr Res* 57: 291-299 (1977).
31. Goforth HW Jr, Arnall DA, Bennett BL and Law PG. Persistence of supercompensated muscle glycogen in trained subjects after carbohydrate loading. *J Appl Physiol* 82 : 342-347 (1997).
32. Graham TE, Adamo KB, Shearer J, Marchand I and Saltin B. Pro- and macroglycogenolysis: relationship with exercise intensity and duration. *J Appl Physiol* 90: 873-879 (2001).

33. Greiwe JS, Hickner RC, Hansen PA, Racette SB, Chen MM and Holloszy JO. Effect of endurance exercise training on muscle glycogen accumulation in humans. *J Appl Physiol* 87: 222-226 (1999).
34. Gunja-Smith Z, Marshall JJ, Mercier C, Smith EE and Whelan WJ. A revision of the Meyer-Bernfeld model of glycogen and amylopectin. *FEBS Lett* 12: 101-104 (1970).
35. Gunja-Smith Z, Marshall JJ and Smith EE. Enzymatic determination of the unit chain length of glycogen and related polysaccharides. *FEBS Lett* 13: 309-311 (1971).
36. Hansen B, Derave FW, Jensen P and Richter EA. No limiting role for glycogenin in determining maximal attainable glycogen levels in rats skeletal muscle. *Am J Physiol* 278: E398-E404 (2000).
37. Hayat MA. Principles and technics of electron microscopy, biological applications. 3ième éd. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, 1989.
38. Illingworth B, Larner J and Cori GT. Structure of glycogens and amylopectins, enzymatic determination of chain length. *J Biol Chem* 199: 631-640 (1952).
39. James DE and Kraegan EN. The effect of exercise training on glycogen, glycogen synthase and phosphorylase in muscle and liver. *Eur J Appl Physiol* 52: 276-281 (1984).
40. Kennedy LD, Kirkman BR, Lomako J, Rodriguez JR and Whelan WJ. Membranes and Muscles. Berman MC, Gevers M and Opie L. éd IRL Press, Oxford, pp 65-84 (1985).
41. Kirwan JP, Costill DL, Flynn MG, Neufer PD, Fink WJ and Morse WM. Effects of increased training volume on the oxidative capacity, glycogen content and tension development of rat skeletal muscle. *Int J Sports Med* 11: 479-483 (1990).
42. Kjaer M. Regulation of hormonal and metabolic responses during exercise in humans. *Exerc Sport Sci Review* 20: 161-184 (1992).
43. Krisman CR and Barengo RA. A precursor of glycogen biosynthesis:  $\alpha$ -1,4-glucan-protein. *Eur J Biochem* 52: 117-123 (1975).
44. Lavoie C, Drouin R, Milot M, Robert G, Massicotte D and Péronnet, F. Hepatic glucagon sensitivity induced by endurance training : effect mediated by increased gluconeogenesis? *Med. Sci. Sports Exerc. (résumé)* 32: S24 #1062 (2000).
45. Lavoie C, Ducros F, Bourque J, Langelier H and Chiasson JL. Glucose metabolism during exercise in man: the role of insulin and glucagon in the regulation of HGP and gluconeogenesis. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 26-35 (1997).
46. Lazarow A. Particulate glycogen: a submicroscopic component of the guinea pig liver: its significance in glycogen storage and regulation of blood sugar. *Anat Rec* 84: 31-50 (1942).
47. Légaré A, Drouin R, Milot M, Massicotte D, Péronnet F, Massicotte G and Lavoie C. Increased density of glucagon receptors in liver from endurance-trained rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E193-1966 (2001).

48. Leloir LF and Goldemberg SH. Synthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose in liver. *J Biol Chem* 235: 919-923 (1960).
49. Lomako J, Lomako WM and Whelan WJ. Proglycogen: a low-molecular-weight form of muscle glycogen. *FEBS Lett* 279: 223-228 (1991).
50. Lomako J, Lomko W, Whelan W, Dombro R, Neary J and Norenberg M. Glycogen synthesis in the astrocyte: from glycogenin to proglycogen to glycogen *FASEB J* 7: 1386-1393 (1993).
51. Madsen NB and Cori CF. The binding of glycogen and phosphorylase. *J Biol Chem* 233: 1251-1254 (1958).
52. Manners DJ. The molecular structure of glycogen. *Adv Carbohydrate Chem* 12: 261-298 (1957).
53. Manners DJ and Wright A.  $\alpha$ -1,4- Glucosans XIII, Determination of the average chain length of glycogen by  $\alpha$ -amylolysis. *J Chem Soc* 1597-1602 (1962).
54. Meléndez R, Melendez-Hevia E and Canela EI. The fractal structure of glycogen: A clever solution to optimize cell metabolism. *Biophys J* 77(3): 1327-32 (1999).
55. Meléndez-Hevia E, Waddell TG and Shelton DE. Optimization of molecular design in the evolution of metabolim: the glycogen molecule. *Biochem J* 295: 477-483 (1993).
56. Mendenhall L A, Swanson SC, Habash DL and Coggan AR. Ten days of exercise training reduces glucose production and utilization during moderate-intensity exercise. *Am J Physiol* 29: E136-E143 (1994).
57. Meyer F, Heilmeyer LMG Jr, Haschke RH and Fischer EH. Control of phosphorylase activity in muscle glycogen particule. I. Isolation and characterization of the protein-glycogen complex. *J Biol Chem* 245: 6642-6648 (1970).
58. Nakatani A, Han DH, Hansen PA, Nolte LA, Host HH, Hickner RC and Holloszy JO. Effect of endurance exercise training on muscle glycogen supercompensation in rats. *J Appl Physiol* 82: 711-715 (1997).
59. Passoneau JV and Lauderdale VR. A comparison of three methods of glycogen measurements in tissues. *Anal Biochem* 60: 405-412 (1974).
60. Pflüger EFW. Das glykogen und seine Beziehungen zur Zuckerkrankheit. Aufl Verlag von Martin Hager, Bonn, 2 (1905).
61. Prevost MC. Glycogen supercompensation enhances athletic performance. *J Perf Enhanc* 1: 1-10 (1999).
62. Rencurel F, Waeber G, Antoine B, Rocchiccioli F, Maulard P, Girard J and Leturque A. Requirement of glucose metabolism for regulation of glucose transporter type 2 (GLUT2) gene expression in liver. *Biochem J* 314: 903-909 (1996).
63. Rendina G. Experimental methods in modern biochemistry. Saunders WB Comp Philadelphia, London, Toronto, p. 157-167 (1971).
64. Roe JH, Bailey JM, Gray RR and Robinson JN. Complete removal of glycogen from tissues by extraction with cold trichloroacetic acid solution. *J Biol Chem* 236: 1244-1246 (1961).

65. Rosati G. Enzyme treatment of glycogen particules in rat liver and muscles. *J Ultrastruct Res* 18: 444-455 (1967.)
66. Rybicka K. Binding of glycosomes to endoplasmic reticulum and to intermediate filaments in cardiac conduction fibers. *J Histochem Cytochem* 29: 553-560 (1981).
67. Rybicka K. Glycosomes (protein-glycogen complex) in the canine heart *Virchows Arch B Cel Path* 30: 335-347 (1979a).
68. Rybicka K. Morphologic recognition of desmoglycogen in cardiac tissue. Bailey GW, éd *Proceeding of 37th Annual EMSA Meeting* 312-313 (1979b).
69. Rybicka K. Morphology, histochemistry and staining of glycogen in the heart. Bailey GW, éd *Proceeding of 35th annual EMSA Meeting* 448-449 (1977).
70. Rybicka KK. Glycosomes - the organelles of glycogen metabolism. *Tissues & Cell* 28 (3): 253-263 (1996).
71. Scott RB and Still WJS. Glycogen in human peripheral blood leucocytes. II. The macromolecular state of leucocyte glycogen. *J Clin Invest* 47: 353-359 (1968).
72. Serafini MT and Alemany M. A micromethod for the enzymatic estimation of the degree of glycogen ramification. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 15: 33-39 (1987).
73. Srere P.A. Citrate Synthase. *Methods Enzymol* 13: 3-5 (1969).
74. Stetten D and Stetten M.R. Glycogen metabolism. *Physiol Rev* 40: 505-537 (1960).
75. Stetten MR, Katzen HM and Stetten D Jr. A comparison of the glycogen isolated by acid and alkaline procedures. *J Biol Chem* 232, 475-488 (1958).
76. Tata JR. Subcellular redistribution of liver  $\alpha$ -glucan phosphorylase during alteration in glycogen content. *Biochem J* 90: 284-292 (1964).
77. Taylor AW, Stothart J, Booth MA, Thayer R and Rao S. Human skeletal muscle glycogen branching enzyme activities with exercise and training. *Can J Physiol Pharm* 529: 119-122 (1974).
78. Tirone TA and Brunicardi F C. Overview of Glucose Regulation. *World J Surg* 25: 461-467 (2001).
79. Tortora GJ and Anagnostakos NP. Principles of Anatomy and Physiology. 4e éd Harper & Row, New York, U.S.A., pp.637-638 (1984).
80. Voet D and Voet JG. Biochemistry. John Wiley & Sons inc., New York, U.S.A., pp. 484-512 (1995).
81. Wilstätter R und Rohdwal M. Über des Zustand des Glykogens in der Leben, in Muskel, und in Leukocyten. *Hoppe Seyler's Z Physiolog Chemie* 225: 103-124 (1934).