

**UNIVERSITE GRENOBLE I - JOSEPH FOURIER
ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES PARIS**

Thèse présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Ecole doctorale : Chimie et Science du Vivant
Spécialité : Physiologie, Physiopathologie et Pharmacologie

**ORGANISATION STRUCTURALE ET
FONCTION METABOLIQUE DES UNITES
ENERGETIQUES INTRACELLULAIRES (ICEUs)
DANS LE MUSCLE CARDIAQUE ET
SQUELETTIQUE :**

Conditions physiologiques et pathophysiologiques

Karen GUERRERO

Soutenue le vendredi 2 décembre 2005

Devant le jury de thèse :

Xavier Leverve

Professeur, Université Grenoble I, Président

Michel Rigoulet

Professeur, Université Bordeaux II, Rapporteur

Xavier Bigard

Professeur, Centre de Recherches du Service de
Santé des Armées, Grenoble, Rapporteur

Annie Andrieux

Docteur, HDR, CEA, Grenoble, Examineur

Christophe Pison

Professeur, CHU, Grenoble, Examineur

Xavier Ronot

Professeur, EPHE, Grenoble, Directeur de
Recherches

Valdur Saks

Professeur, Université Grenoble I, Directeur de
Recherches

Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale & Appliquée,
INSERM E0221-UJF

Résumé

Ce travail de thèse s'intéresse principalement à la régulation de la respiration mitochondriale *in situ* dans les cellules de muscle cardiaque et squelettiques. L'oxygraphie, la spectrophotométrie et la microscopie confocale sur cellules isolées ou fibres musculaires perméabilisées à la saponine ont été utilisées ainsi que la modélisation mathématique. Dans les cellules musculaires, les mitochondries sont organisées de manière très précise tel un 'cristal'. Cet arrangement intracellulaire serait la base d'une organisation à la fois structurale et fonctionnelle au sein desquelles les mitochondries sont couplées fonctionnellement par le cytosquelette aux autres organelles : réticulum sarcoplasmique et myofibrilles: les ICEUs (ou unités énergétiques intracellulaires). Au sein des cellules cardiaques, il existe 2 niveaux de régulation de la respiration mitochondriale par l'ADP exogène : la perméabilité de la membrane mitochondriale externe (VDAC) et des restrictions localisées de diffusion de l'ADP au voisinage des mitochondries. La β -tubuline participe indirectement à ces mécanismes de régulation de même que la protéine STOP, une protéine associée aux microtubules. Ces données expérimentales sont utiles pour expliquer les aspects métaboliques de la loi de Frank-Starling dans le cœur. Cette notion d'ICEU peut servir de diagnostique lors de l'étude clinique du métabolisme énergétique chez des transplantés pulmonaires avant et après un programme d'entraînement à domicile.

Mots clés: mitochondrie, phosphorylation oxydative, ICEU, muscle cardiaque et squelettique, couplage fonctionnel, compartimentation, canalisation métabolique, β -tubuline, protéine STOP, transplanté pulmonaire, entraînement à domicile.

Abstract

The aim of this work was to study the regulation of mitochondrial respiration *in situ* in cardiac and skeletal muscle cells. Oxygraphy, spectrophotometry and confocal microscopy on saponin-permeabilized muscle cells or fibers were used as well as mathematic modelisation. In muscle cells, mitochondria are ordered very precisely in 'a crystal like pattern'. This intracellular arrangement could be the basis of a structural and functional organisation within which mitochondria are functionally coupled by cytoskeleton to the other organelles: sarcoplasmic reticulum and myofibrils: ICEUs (intracellular energetic units). In cardiac cells, there are two levels of regulation of mitochondrial respiration by exogenous ADP: permeability of the outer mitochondrial membrane (VDAC) and localized restrictions of ADP diffusion in the neighbourhood of mitochondria. β -tubulin and STOP protein, a microtubule-associated protein, participate indirectly to these mechanisms of regulation. These experimental data are useful for explaining the metabolic aspects of the Frank-Starling law of the heart. The notion of ICEU can be diagnostically used in clinical study of energetic metabolism of lung recipients transplants before and after a home-interval training program.

Keywords: mitochondria, oxidative phosphorylation, ICEU, cardiac and skeletal muscles, functional coupling, compartmentation, metabolic channelling, β -tubulin, STOP protein, lung recipient transplant, home training.

Table des matières

Liste des abréviations	p 5
Publications	p 7
Participation à des conférences	p 9
Préambule	p 11
<u>I. Introduction : Etat actuel des connaissances</u>	p 12
A. Organisation des cellules musculaires striées	
A.1. Production de l'ATP dans la mitochondrie	
A.1.1. Description générale de la mitochondrie	p 13
A.1.2. Chaîne respiratoire et formation du potentiel membranaire	p 14
A.1.3. L'ATPase-synthase mitochondriale	p 17
A.1.4. La famille des transporteurs mitochondriaux et le Voltage Dependant Anion Channel	
1.4.1. L'Adénine Nucléotide Translocase	p 20
1.4.2. Les canaux VDAC	p 23
A.1.5. Le calcium mitochondrial	p 25
A.2. La consommation d'ATP	
A.2.1. Appareil contractile cycle contractile	p 26
2.1.1. Les myofilaments	p 26
2.1.2. La contraction du muscle strié	p 27
A.2.2. Cycle du Ca ²⁺ cytoplasmique	p 31
2.2.1. Structures intracellulaires contrôlant les niveaux de Ca ²⁺ cytoplasmique	p 32
2.2.2. Ca ²⁺ sparks et Ca ²⁺ quarks	p 33
A.3. Transfert d'énergie par la navette de la créatine kinase et les problèmes de sa régulation	
A.3.1. Les Créatine kinases	p 34
A.3.2. Phénomène de couplage fonctionnel	p 36
3.2.1. Couplage fonctionnel entre créatine kinase mitochondriale et adénine nucléotide translocase	p 36
3.2.2. Couplage fonctionnel entre créatine kinase MM et MgATPases	p 38

A.3.3. Conséquences métaboliques du couplage fonctionnel des créatine kinases p 39

A.4. Régulation de la respiration *in situ*

A.4.1. Régulation de la respiration par l'ADP : fibres perméabilisées p 44

A.4.2 Cinétique de la régulation de la respiration par l'ADP *in situ* p 46

A.4.3 Traitement protéolytique et contrôle respiratoire p 49

A.5. ICEUs et communication intracellulaire

A.5.1. Notion d'unités énergétiques intracellulaires : ICEUs p 51

A.5.2. Canalisation métabolique p 53

A.6. Cytosquelette p 55

A.6.1. Le cytosquelette dans les cellules musculaires p 59

6.1.1. Le cytosquelette d'actine dans le cœur p 61

6.1.2. Les filaments intermédiaires : la desmine p 62

6.1.3. Les microtubules dans les cellules musculaires p 64

6.1.4. Les microtubules associated-proteins : la protéine STOP p 66

A.6.2. Les phénomènes de fission et fusion des mitochondries p 67

6.2.1. Fission et fusion mitochondriale dans le muscle cardiaque et squelettique p 69

B. Fonction mitochondriale musculaire du sujet transplanté pulmonaire (TP) et réhabilitation

B.1. La transplantation pulmonaire p 71

B.1.1. Histoire de greffes d'organe p 71

B.1.2. La transplantation pulmonaire p 72

B.1.3. Le handicap physique du Transplanté Pulmonaire (TP) p 75

B.1.4. Altérations centrales p 75

B.1.5. Altérations périphériques : le muscle squelettique du TP p 75

B.2. Adaptation de la fonction mitochondriale du muscle squelettique à un programme de réhabilitation physique

B.2.1. Contrôle et adaptation du phénotype musculaire p 75

B.2.1.1. Rappels des modalités du typage histochimique des fibres musculaires p 75

B.2.1.2. Notion de phénotype musculaire p 76

B.2.2. Modifications induites sur le phénotype musculaire par l'entraînement p 77

B.2.2.1. Les facteurs limitant la consommation maximale d'oxygène (VO₂max) p 77

B.2.2.2. Les facteurs centraux	p 77
B.2.2.3. Les facteurs périphériques	p 78
B.2.3. Modifications du phénotype musculaire après l'entraînement	p 79
B.2.3.1. Effets sur le phénotype contractile	p 79
B.2.3.2. Effets sur le phénotype métabolique	p 80

II. Objectifs scientifiques

p 82

III. Matériel et Méthodes

p 86

A. Description des expérimentations

1. Animaux	p 87
2. Technique des fibres perméabilisées à la saponine	p 88
3. Isolement des cardiomyocytes adultes de rat	p 89
4. Isolement de mitochondries de cœur de rat	p 91
5. Extraits musculaires de rat	p 92
6. Sujets humains	p 93
6.1. Témoins	p 93
6.2. Sujets transplantés pulmonaires (TP)	p 94
7. Protocole clinique	p 95
7.1. La biopsie musculaire à la pince chez l'Homme	p 95
7.2. Evaluations des sujets	p 97

B. Techniques d'étude de la fonction mitochondriale

1. Principe de l'oxygraphie	p 99
2. Tests oxygraphiques utilisés	p 100
3. Principe de la spectrophotométrie	p 104
4. Utilisation d'un système d'enzymes couplées	p 105

C. Techniques d'imagerie intracellulaire

1. La microscopie confocale et biphotonique	p 108
2. Technique d'immunofluorescence indirecte	p 116
3. Distribution des mitochondries dans les cellules musculaires	p 118

D. Modèle mathématique des restrictions de diffusion p 119

IV. Résultats et Discussion p 122

1. Etude de l'organisation intracellulaire des mitochondries par imagerie confocale : approche qualitative et quantitative. p 123

“Mitochondrial regular arrangement in muscle cells: a "crystal-like" pattern”

2. Etude *in situ* et *in silico* de l'hétérogénéité de diffusion de l'ADP et de la respiration mitochondriale dans les cellules perméabilisées. p 126

“Heterogeneity of ADP diffusion and regulation of respiration in cardiac cells”

3. Etude de la régulation de la fonction mitochondriale et de la stabilité métabolique : analyse du couplage ANT-MiCK p 130

“Functional coupling as a basic mechanism of feedback regulation of cardiac energy metabolism”

“The creatine kinase isoenzymes in organized metabolic networks and regulation of cellular respiration: a new role for Maxwell's demon”

4. Etude du rôle potentiel de la tubuline, du réseau microtubulaire et de la protéine STOP dans l'organisation intracellulaire des mitochondries et dans la régulation de la fonction mitochondriale dans les cellules musculaires striées. p 137

”Study of the roles of microtubular system, tubulin and STOP protein in regulation of mitochondrial function in muscle cells”

5. Etude des modifications de la respiration mitochondriale de muscle squelettique chez des transplantés pulmonaires avant et après réhabilitation. p 147

“Bioenergetics of skeletal muscles after lung transplantation. Effects of home exercise training”

V. Conclusions et Perspectives p 147

VI. Bibliographie p 152

Liste des abréviations utilisées

ADP : Adénosine DiPhosphate

ANT : Adénine Nucléotide Translocase

AK : Adénylate Kinase

AMP : Adénosine MonoPhosphate

AP₅A : diadénosinepentaphosphate

ATP : Adénosine TriPhosphate

ATR : Atractyloside

BKA : acide bongkrélique

BPCO : BronchoPneumopathie Chronique Obstructive

CAT : carboxattractyloside

CCCP : CarbonylCyanide m-Chloro Phénylhydrazone

CICR : Ca-induced Ca-release

CK : Créatine Kinase

Cr : Créatine

CsA : Cyclosporine A

DF : Diffusion Factor

DHPR : récepteurs à la dihydropyridine

DRP : Dynamin-related protein

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FCCP : Carbonyl Cyanide p-(triFluorométhoxy)Phénylhydrazone

FMN : Flavine MonoNucléotide

G-6-PDH : Glucose-6-Phosphate Deshydrogénase

Hb : Hémoglobine

HK : HexoKinase

ICEU : Intra Cellular Energetic Unit

IF : Intermediate Filament

kDa : kilo Dalton

K/O : Knock-Out

LDH : Lactate Déshydrogénase

MAP : Microtubule Associated Protein

MF : MicroFilament

MME : membrane mitochondriale externe

MMI : membrane mitochondriale interne

MT : MicroTubule

MiCK : isoforme mitochondriale de la créatine kinase

MtCK : isoforme mitochondriale de la créatine kinase

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NAO : Nonyl Acridine Orange

PCr : PhosphoCréatine

PEP : PhosphoEnolPyruvate

PF : Permeability Factor

PK : Pyruvate Kinase

PTP : Pore de Transition de Perméabilité

ROS : Reactive Oxygen Species

RS : Réticulum Sarcoplasmique

RyR: récepteurs à la ryanodine

STOP : Stabilizing Tubule Only Polypeptide

TP : Transplanté Pulmonaire

UCP : UnCoupling Proteins

VDAC : Voltage Dependant Anion Channel

Publications

1. F. Appaix, **K. Guerrero**, D. Rampal, M. Izikki, T. Kaambre, P. Sikk, D. Brdiczka, C. Riva-Lavieille, J. Olivares, M. Longuet, B. Antonsson and V.A. Saks. (2002). *Bax and heart mitochondria: uncoupling and inhibition of respiration without permeability transition*. Biochim Biophys Acta 2002 Dec 2;1556 (2-3):155-67

2. V. Saks, F. Appaix, Y. Usson, **K. Guerrero**, J. Olivares, E. Seppet, M. Aliev, R. Margreiter and A. Kuznetsov. (2003). *Localized control of oxidative phosphorylation within intracellular energetic units in heart cells : a possible solution of some old problems*. vol. Myocardial ischemia, éditeur N. Dhalla, Kluwer, Academic Publishers, New York. pp.265-284

3. Saks V., Kuznetsov A., Andrienko T., Usson Y., Appaix F., **Guerrero K.**, Kaambre T., Sikk P. and Vendelin M.. (2003). *Heterogeneity of ADP diffusion and regulation of respiration in cardiac cells*. Biophys J 2003 May;84(5):3436-56

4. V.A. Saks, A.V. Kuznetsov, M; Vendelin, **K. Guerrero**, L. Kay and E.K. Seppet. (2004). *Functional coupling as a basic mechanism of feedback regulation of cardiac energy metabolism*. Molecular and Cellular Biochemistry 256/257: 185-199

5. M. Vendelin, N.Béraud*, **K. Guerrero***, T. Andrienko, A. Kuznetsov, J. Olivares, L. Kay and V. Saks (*equal contribution, ordered alphabetically). (2005). *Mitochondrial regular arrangement in muscle cells : a « crystal-like » pattern*. Am. J. Physiol.-Cell. Physiol. 288(3):C757-67.

6. V. Saks, **K. Guerrero**, M. Vendelin, J. Engelbrecht, E. Seppet. (2005). *The creatine kinase isoenzymes in organized metabolic networks and regulation of cellular respiration: a new role for Maxwell's demon*. V. Uversky (Ed.)"Molecular Anatomy and Physiology of Proteins", NovaScience Publisher, NY, (sous presse).

7. Ch. Pison, J.C. Borel, **K. Guerrero**, D. Veale, B. Wuyam. (2005). *Physiopathologie de la désadaptation à l'effort au cours des maladies respiratoires chroniques*. Réhabilitation des maladies respiratoires chroniques. B. Salleron ed.(sous presse)

8. **K. Guerrero**, B. Wuyam, P. Mezin, I. Vivodtzev, M. Vendelin, J.C. Borel, R. Hacini, O. Chavanon, S. Imbeaud, V. Saks, Ch. Pison. (2005). *Bioenergetics of skeletal muscles after lung transplantation. Effects of home exercise training*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 289: 1144-1154.

9. **Guerrero K**, Andrieux A, Puurand U., Vendelin M., Olivares J., Job D., Seppet E. and Saks V. *Study of the roles of microtubular system, tubulin and STOP protein in regulation of mitochondrial function in muscle cells* (en préparation)

Participation à des conférences

- **12th European BioEnergetics Conference** (10-15 septembre 2002, Arcachon, France)

poster:

« Confocal immunofluorescence : microscopic study of mitochondrial-cytoskeletal interactions in isolated cardiomyocytes »

K. Guerrero, F. Appaix, Y. Usson, J. Olivares, V. Saks

- **XX^{ème} congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire** (15-16 avril 2003, Grenoble, France)

poster :

« Organisation structurale et fonction métabolique des unités énergétiques intracellulaires (ICEUs) dans le muscle cardiaque »

K. Guerrero, Y. Usson, J. Olivares, V.A Saks

- **32nd European Muscle Conference** (7-10 septembre 2003, Montpellier, France)

poster :

« **Metabolic regulation inside the intracellular energetic units (ICEUs)** »

K. Guerrero, N. Béraud and V. Saks.

- **13th European Respiratory Society Annual Congress** (27 septembre-01 octobre 2003, Vienna, Austria)

communication orale

« Permeabilized skeletal muscle fiber technique: a tool to unravel energy metabolism dysfunction in myopathy during chronic lung diseases »

K. Guerrero, C. Pison, B. Wuyam, L. Kay, J. C. Borel, R. Hacini, B. Aguilaniu, P. Mezin, V. Saks

- **48th Annual Meeting of Biophysical Society** (14-18 février 2004, Baltimore, USA)

poster:

« Metabolic regulation inside the intracellular energetic units (ICEUs) »

K. Guerrero, Annie Andrieux, Florence Appaix, José Olivares, Didier Job, V. Saks

- **5^{èmes} Journées Francophones Alvéole** (4-6 mars 2004, Montpellier, France)

poster :

« Modifications de la respiration mitochondriale du muscle squelettique chez les transplantés pulmonaires : effets de la réhabilitation »

K. Guerrero, C. Pison, B. Wuyam, L. Kay, J.C. Borel, R. Hacini, B. Aguilaniu, P. Mezin, V. Saks

- **6th International Congress on Lung Transplantation** (16-17 septembre 2004, Paris, France)

communication orale:

“Bioenergetic correlations in skeletal muscles after pulmonary transplantation: positive effects of mild physical training”

K. Guerrero, C. Pison, B. Wuyam, L. Kay, J. C. Borel, R. Hacini, B. Aguilaniu, P. Mezin, V. Saks

- **XV^{èmes} Rencontres Régionales de la Recherche** (18 octobre 2004, Lyon, France)

poster:

« Organisation structurale et fonction métabolique des unités énergétiques intracellulaires dans le cœur et le muscle squelettique dans des conditions physiologiques et pathophysiologiques »

Karen Guerrero

- **1^{ères} Journées de Recherche Respiratoire** (13-15 octobre 2005, Reims, France)

poster

« Couplage fonctionnel accru entre l'adénine nucléotide translocase et la créatine kinase mitochondriale du muscle squelettique après réhabilitation chez le transplanté pulmonaire »

K. Guerrero, B. Wuyam, P. Mezin, I. Vivodtzev, R. Guzun, C. Ramonatxo, S. Imbeaud, C. Auffray, V. Saks, C. Pison

Préambule

La mitochondrie est l'organite incontournable lorsque l'on aborde le thème de la bioénergétique cellulaire. La connaissance actuelle de la synthèse d'ATP dans les mitochondries est basée sur la théorie chimiosmotique de Peter Mitchell (1961), qui a permis d'éclairer le mécanisme de phosphorylation oxydative. Depuis longtemps, la mitochondrie a été étudiée sous forme isolée et, les études *in situ* datent seulement d'une dizaine d'années. Ces expériences ont été rendues possibles avec l'apparition de nouvelles techniques telles que les fibres perméabilisées et la microscopie confocale. Les mitochondries *in vivo* et leurs interactions cellulaires sont impliquées dans divers processus tels que le phénomène de contraction, le transport des ions, etc. Les caractéristiques de la respiration mitochondriale, comme le K_m pour l'ADP, sur mitochondries isolées, dépourvues de leur environnement cytoplasmique, sont très différentes de celles obtenues dans les fibres ou les cardiomyocytes isolés. Ainsi, la problématique de la régulation de la fonction mitochondriale est apparue puisque les paramètres cinétiques *in vitro* ne sont pas identiques à ceux trouvés *in vivo*.

Le but de ce travail est l'étude dans les cellules de muscle cardiaque et squelettique *in vivo*, d'une part de l'activité respiratoire mitochondriale et d'autre part, de l'arrangement des mitochondries et du cytosquelette, basé sur des méthodes récentes d'imagerie telles que la microscopie confocale.

INTRODUCTION :

Etat actuel des connaissances

A. Organisation des cellules musculaires striées

A.1. Production de l'ATP dans la mitochondrie

A.1.1. Description générale de la mitochondrie

La mitochondrie est un organite indispensable dans les cellules animales. En effet, elle est le siège de la respiration et le lieu de production de l'ATP, servant à tout le métabolisme des êtres vivants.

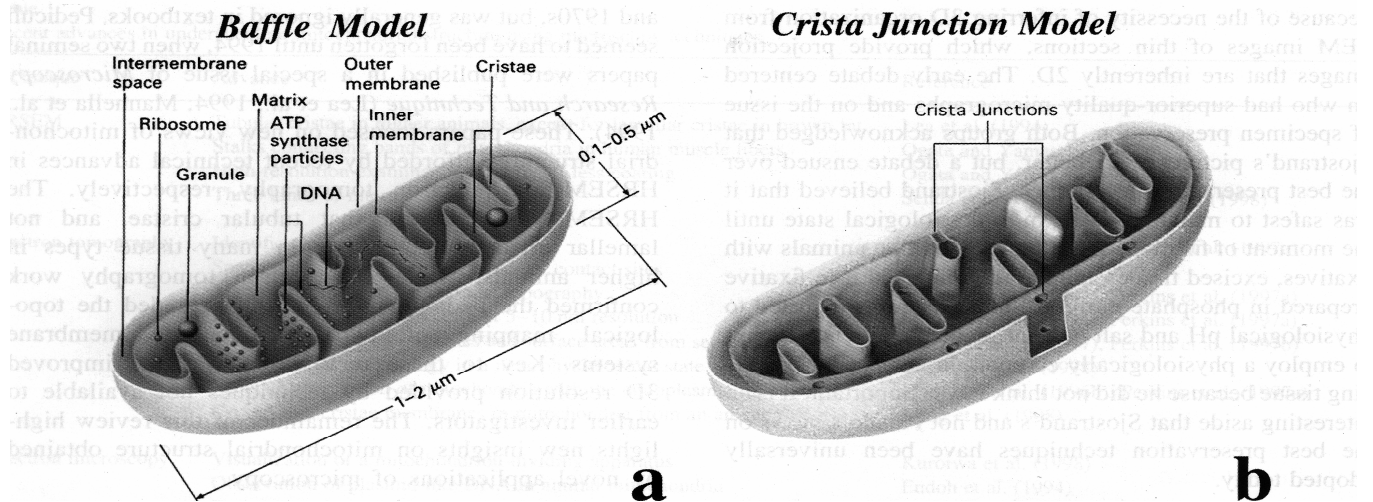
La mitochondrie est un organite semi-autonome qui possède son propre ADN qui permet de coder pour certaines sous-unités des protéines de sa structure et de son fonctionnement, cependant elle est obligée d'importer la plus grande majorité des protéines qui lui sont nécessaires. Le nombre de mitochondries par cellule est relativement constant et caractéristique d'un type déterminé de cellules. La microscopie électronique a révélé que les mitochondries ont, dans la cellule intacte, les dimensions d'une bactérie : 1-2 μm de long et moins d'1 μm de large. Elles peuvent occuper une fraction importante du volume cellulaire, par exemple 30-35% dans la cellule du muscle cardiaque.

Elle comporte une double membrane : une membrane externe (MME) et une membrane interne (MMI) séparées par un espace intermembranaire. La membrane interne délimite un compartiment soluble appelé matrice, dans laquelle a lieu le cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs). La membrane interne forme des replis également appelés "crêtes".

Les visualisations tridimensionnelles des mitochondries *in situ*, grâce à la tomographie électronique ont permis d'établir ce nouveau modèle d'architecture membranaire (Fig. 1). Contrairement à l'ancien modèle où l'on pensait que de larges ouvertures connectaient l'espace intracrêtes à l'espace intermembranaire, on a pu observer que d'étroites ouvertures tubulaires (jonctions intercrêtes) connectent en réalité ces deux espaces. La plupart des crêtes possèdent plus d'une jonction intercrêtes et celles-ci peuvent se trouver du même côté de la périphérie mitochondriale ou sur des côtés opposés si la crête s'étend complètement en travers de la matrice.

Les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale sont situées dans la membrane interne de la mitochondrie.

Fig 1. Modèles des structures membranaires mitochondriales (a) le modèle le plus communément admis depuis les années 50 (décrit par Palade et al., 1952-53). (b) le modèle des jonctions entre crêtes (jonctions intercrêtes ou crista junction) qui supplante le modèle de Palade dans toutes les mitochondries d'animaux supérieurs examinées à ce jour.) (d'après Perkins et Frey, 2000)

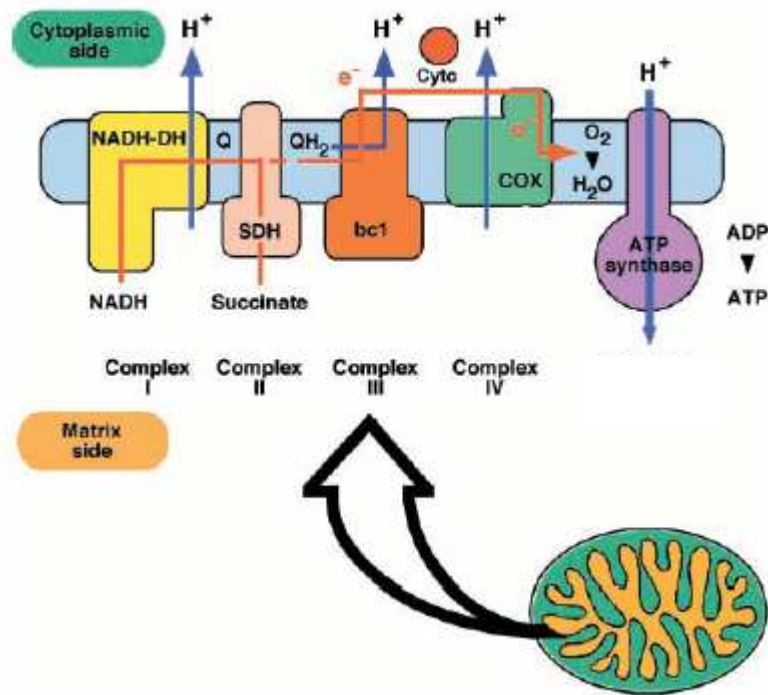


1.2. Chaîne respiratoire et formation du potentiel membranaire

Les organismes aérobies synthétisent l'ATP par 2 procédés : la glycolyse dans le cytoplasme et la phosphorylation oxydative dans la membrane interne mitochondriale. Dans la membrane interne, on rencontre les principaux complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire. Elle est composée de quatre complexes servant au transport des électrons du NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) ou du succinate à l'oxygène. Ces complexes (I, II, III et IV) sont intégrés dans la membrane interne, d'autres éléments sont attachés de manière labile (cytochrome c). Les substrats et les produits, portés par des coenzymes, sont des couples d'oxydoréduction.

Le complexe I, oxyde le NADH en NAD^+ , réduit le coenzyme Q en coenzyme QH_2 et pompe des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Le complexe II, oxyde le succinate en fumarate et réduit le coenzyme Q en coenzyme QH_2 . Le complexe III, oxyde le coenzyme QH_2 en coenzyme Q, réduit le cytochrome c (cyt c) ferrique en cytochrome c ferreux et pompe des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Le complexe IV, oxyde le cytochrome c ferreux en cytochrome c ferrique, réduit l'oxygène en eau et pompe des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire.

Fig. 2. Schéma des enzymes de la membrane mitochondriale interne impliquées dans la phosphorylation oxydative. (modifié d'après Saraste., 1999).



Composants protéiques de la chaîne mitochondriale de transfert d'électrons :

<u>Complexe</u>	<u>Masse (kDa)</u>	<u>Nb de sous-unités</u>	<u>G. prosthétiques</u>
I. NADH UQ réductase	850	>25	FMN, Fe-S
II. Succinate UQ oxydoréductase	140	4	FAD, Fe-S
III. Ubiquinone-cyt c oxydoréductase	250	10	Hèmes, Fe-S
IV. Cytochrome oxydase	160	6-13	Hèmes, Cu _A , Cu _B

L'activité de pompage des protons par les complexes I, III et IV conduit à une grande différence de concentration des protons de part et d'autre de la membrane interne : il s'établit un gradient de concentration de protons (voir Fig 2.). Ce gradient se manifeste par une différence de pH entre la matrice et l'espace intermembranaire, ce dernier étant plus acide que

la matrice. A la fois, le déplacement des protons à travers la MMI et le mouvement des électrons dans la chaîne respiratoire créent la différence de potentiel électrique, $\Delta\Psi$.

Les protons ainsi libérés entraînent la création d'une force proton motrice entre l'espace intermembranaire et la matrice. La théorie chimiosmotique de Peter Mitchell (1961) est basée sur la théorie du potentiel électrochimique de Gibbs (Nicholls et Fergusson., 2002) :

Dans le cas général du potentiel électrochimique $\mu_i = \mu_0 + RT \ln C_i + zF\Psi$, à la fois les composants chimiques (concentrations) et électrique (potentiel Ψ) sont concernés et cette formule est valable pour tous les composés i , μ_0 , correspondant aux conditions standards.

$\Delta\mu_i$, le gradient de potentiel électrochimique la variation d'énergie de Gibbs pour un composé i , définit le changement d'énergie libre lié au transfert d'un ion à travers la membrane.

Le gradient du potentiel électrochimique des protons, $\Delta\mu_{H^+}$, se compose de deux parties suivantes :

En absence de potentiel membranaire, on a

$$\Delta\mu_i = 2.3 RT \log (C_{ext}/C_{int})$$

Par contre, si le transfert d'un ion est dirigé par le potentiel membranaire en absence de gradient de concentration, on a

$$\Delta\mu_i = -zF \Delta\Psi$$

avec F : la constante de Faraday et z : la charge de la molécule.

Selon Mitchell, puisqu'il y a un pompage des protons il existe une différence de concentrations entre les deux côtés de la membrane donc on peut définir le gradient du potentiel électrochimique de protons et la différence du potentiel électrique, comme suit :

$$\Delta\mu_{H^+} = 2.3 RT \log (C_{ext}/C_{int}) + zF \Delta\Psi$$

Avec $z = 1$, or- $\log C = \text{pH}$, on a donc

$$\Delta\mu_{H^+} = - 2.3 RT \log (\text{pH}_{ext}-\text{pH}_{int}) + F \Delta\Psi$$

On divise par F afin d'obtenir l'expression de la force proton motrice p exprimée en volts, ce qui donne :

$$\Delta\mu_{H^+}/F = \Delta p = - (2.3 RT/F) \Delta\text{pH} + \Delta\Psi$$

Où $\Delta\Psi$ est la force électrique due au déplacement des H^+ et des électrons à travers la MMI et où ΔpH est le potentiel chimique.

La théorie chimiosmotique implique que la membrane interne est imperméable aux protons, sinon le gradient se dissiperait au fur et à mesure. Toutefois, il existe une petite fuite de protons.

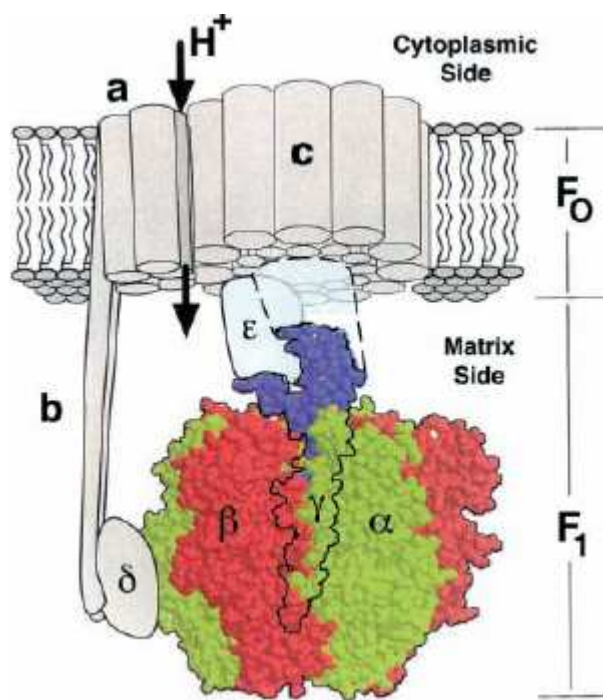
1.3. La MgATP synthase-MgATPase, F_0 - F_1 , mitochondriale

L'ATP synthase localisée dans la membrane interne mitochondriale est responsable de la phosphorylation de l'ADP en ATP. Elle est composée de 2 parties : une partie membranaire insérée dans la membrane interne de la mitochondrie, F_0 , qui est un canal à protons utilisant la différence de gradient électrochimique des protons pour faire passer l'énergie à la partie F_1 (la tête appelée corpuscule de Racker) qui dépasse fortement de la membrane vers la matrice mitochondriale. F_1 est attachée par quelques sous-unités à la membrane interne. Cette tête est formée de plusieurs sous-unités qui synthétisent l'ATP dans la mitochondrie. Cette structure se voit très nettement au microscope électronique. L'ATPase mitochondriale bovine est une protéine complexe constituée de 16 sous-unités différentes atteignant une masse totale supérieure à 500 kDa (Saraste, 1999).

La structure du domaine F_1 a été déterminée par cristallographie.

Les sous-unités a , b , δ , α (3 copies) et β (3 copies) constituent le stator, les sous-unités c , γ et ϵ constituent le rotor dont la rotation transfère l'énergie du flux de proton à la synthèse de l'ATP.

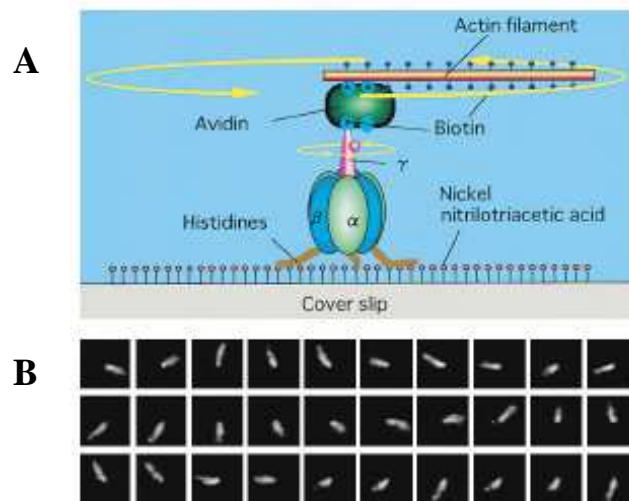
Fig. 3. Structure de la MgATP synthase-ATPase F_0 - F_1 . (D'après Wang et Oster., 1998).



F₀F₁, l'ATP synthase, utilise l'énergie du gradient du potentiel électrochimique des protons pour la synthèse de l'ATP par un mécanisme rotatoire, découvert par Boyer et Walker qui ont été récompensés par le prix Nobel de chimie en 1997.

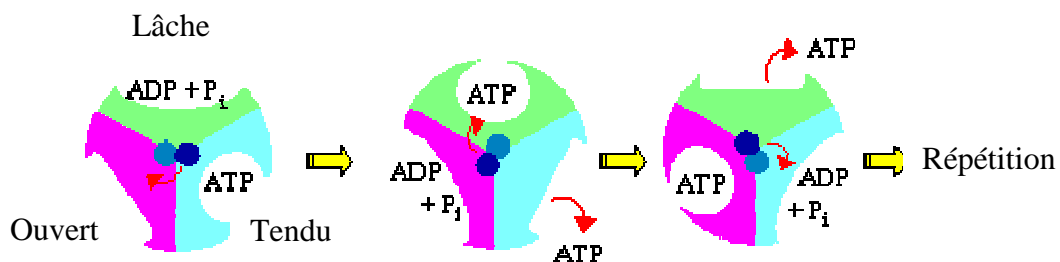
La rotation de la tige γ du rotor déforme les 3 sous-unités β du stator qui contiennent les sites actifs de synthèse d'ATP. Cette observation a été rapportée par Noji et al (Noji et al., 1997) qui ont utilisé un ingénieux système de filament d'actine fluorescent attaché à la sous-unité γ par de la biotine et de l'avidine et une fixation du complexe $\alpha_3\beta_3\gamma$ par des histidines sur une couverture de nickel (Fig. 4).

Fig. 4. Observation de la rotation de F₁. (A). Système utilisé. (B). Images vidéos d'un filament d'actine en rotation induite par l'ATP (intervalle d'images 133 ms). (D'après Kinosita et al., 1998)



Les sous-unités β passent par les états O (ouvert), L (lâche) et T (tendu). Une rotation complète du rotor produit 3 ATP. Il s'agit du "binding change mechanism" (ou mécanisme liaison-échange). La sous-unité β possède, selon sa conformation, une affinité différente pour l'ATP.

Fig. 5. Schéma du mécanisme liaison-échange. (D'après Cross, 2000)



Contrairement aux enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale, F_0 transfère les protons de l'espace intermembranaire vers la matrice (Yasuda et al., 2001 ; Elston et al., 1998).

Chaque sous-unité c a un Asp (61) qui ne peut être en contact avec les lipides que s'il est protoné. Seules deux positions permettent la déprotonation, chacune en contact avec a et associée à un demi-canal vers l'une des surfaces de la membrane. Un proton doit faire un tour presque complet de l'anneau entre son entrée par le haut et sa sortie par le bas (Fig. 3). La protonation de l'Asp-61 par un proton venu du haut lui permet de tourner vers la droite, dans la membrane. Ceci fait passer l'Asp-61 de gauche à droite et permet à un Asp-61 protoné de plus loin à gauche de venir sur la position déprotonable de gauche. Le proton dissocié part vers le bas. Le résultat de l'entrée par le haut d'un proton et de la sortie par le bas est la rotation de l'anneau de c d'une unité vers la droite. La sous-unité ϵ fait partie du rotor et sa

rotation peut être observée lors de l'hydrolyse de l'ATP. Ainsi, les sous-unités γ et ϵ tournent ensemble dans le même sens respectivement aux sous-unités $\alpha_3\beta_3\delta b_2$. La synthèse et l'hydrolyse de l'ATP se font elles en sens inverse (Cross, 2000). Ce faisant, l'ATP synthase récupère l'énergie de $\Delta\mu_{H^+}$. Cette énergie est couplée par la rotation de la sous-unité γ à la réaction de phosphorylation de l'ADP par un phosphate inorganique en présence de magnésium, réaction endergonique qui consomme 31 kJ/mol.

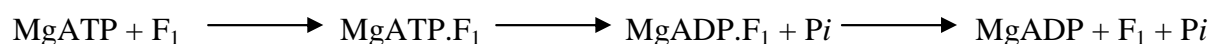
La MgATPase F_0 - F_1 est inhibée par l'oligomycine, au niveau de la sous-unité F_0 .

L'efficacité stoechiométrique de la phosphorylation oxydative est définie par le rapport P/O, ou la quantité de phosphate inorganique incorporé en ATP par quantité d'atomes d'oxygène consommés. L'oxydation d'une molécule de dihydro nicotinamide adenine nucleotide (NADH), de 1,5-dihydro-flavine adenine dinucleotide ($FADH_2$) et de l'ascorbate est associée à la synthèse de 3, 2 et 1 molécules d'ATP respectivement. Le rapport maximal de P/O pour les substrats liant le NAD est de 2.5-3 et de 1.5-2 pour le succinate (Lee et al., 1996a, Hinkle et al., 1979). Pour une molécule d' O_2 réduite, 20 protons sont transférés et 6 molécules d'ATP sont synthétisées, donnant le rapport H^+/ATP de 3-4.

Le découplage de la phosphorylation oxydative décrit n'importe quel procédé qui décroît le Δp (Kadenbach, 2003), donc aboutissant à une perte d'énergie et une thermogénèse élevée. Les agents capables de dissiper le gradient de protons et ainsi diminuer le rapport P/O sont appelés les découplants de la phosphorylation oxydative (Heytler, 1980, Terada, 1990). Ils induisent une fuite de protons non spécifique à travers la membrane interne mitochondriale (Terada, 1990). Les agents découplants (dinitrophénol, carbonylcyanide m-chloro phenylhydrazone (CCCP), carbonylcyanide-p-trifluorométhoxy-phenylhydrazone (FCCP) et les acides gras) abolissent le lien entre la chaîne respiratoire et le système de phosphorylation résultant en un flux de protons vers la matrice (fuite de protons ou proton leak).

Si la respiration est découplée, il n'y a pas de gradient de protons. Il se produit alors, la réaction d'hydrolyse de l'ATP. En effet, l'affinité pour l'ATP est modifiée et γ se met à tourner dans le sens inverse afin de recréer elle-même un gradient de protons.

Cette réaction est de type ordonnée :



Ainsi, l'activité de l'ATPase rend compte du découplage existant dans la mitochondrie.

La phosphorylation oxydative est le mécanisme réalisant le couplage de la diminution de l'énergie libre qui accompagne le transfert des électrons sur la chaîne respiratoire avec la formation de groupes phosphates riches en énergie dans l'ATP.

La phosphorylation oxydative est primordiale dans tous les aspects de la vie cellulaire aérobie car elle constitue la principale source d'énergie utilisable.

1.4. La famille des transporteurs mitochondriaux et le Voltage Dependant Anion Channel

La membrane interne mitochondriale contient une famille de protéines (Mitochondrial Carrier Family, MCF) dont la fonction est de transporter de multiples substrats dans la matrice mitochondriale et d'exporter les métabolites. L'adénine nucléotide translocase (ANT), un transporteur de phosphate, les « uncoupling proteins » (UCP) font partie de ces protéines. Cette famille compte également de multiples transporteurs des métabolites du cycle de Krebs (Aquila et al., 1987, Garlid et al., 2000). La membrane externe contient des canaux anioniques voltage-dépendants (VDAC ou Voltage-Dependant Anion Channel) pour la communication entre la mitochondrie et le cytosol.

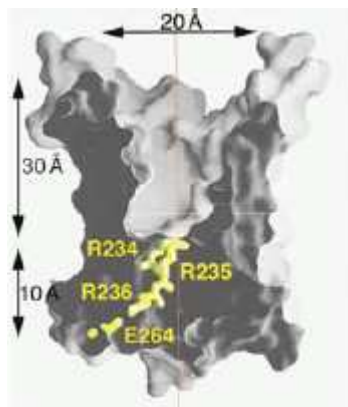
1.4.1. L'Adénine Nucléotide Translocase

L'ANT (également appelé transporteur ATP/ADP) est un lien énergétique clé dans le transport d'énergie entre les compartiments de la mitochondrie et du cytoplasme. Cet antiport est responsable de l'échange transmembranaire entre l'ATP généré au sein de la mitochondrie par la phosphorylation oxydative et l'ADP cytosolique. L'ANT consiste en 300 acides aminés environ et, est localisé dans la membrane interne mitochondriale. Sa quantité peut atteindre 10% des protéines de la membrane interne dans les mitochondries de tissus qui ont des besoins énergétiques élevés (Klingenberg, 1969, Kramer et al., 1989, Klingenberg, 1979). L'ANT est étroitement associé à six molécules de cardiolipines (Beyer et Klingenberg., 1985) requises pour la translocation des nucléotides (mais pas pour leur liaison) (Hoffmann et al., 1994).

Sur la base d'expériences de centrifugation analytique et de diffusion de neutrons réalisées en présence d'inhibiteurs spécifiques, l'ANT est considéré comme étant organisé en homodimères (Block et al., 1982, Hackenberg et Klingenberg., 1980). En revanche, des données biochimiques supportent l'hypothèse que la forme fonctionnelle de l'ANT serait un homotétramère, chaque dimère étant impliqué dans le transport d'un nucléotide, ATP ou ADP (Brandolin et al., 1985, Fioret et al., 1998).

L'échange spécifique de nucléotides entre le cytosol et la matrice mitochondriale suit une stoechiométrie stricte de 1:1, c'est-à-dire pour un ADP importé un ATP est exporté à travers la membrane interne mitochondriale (l'AMP n'est pas transporté). L'échange ATP/ADP suit la cinétique de Michaelis-Menten, avec un K_m de 1-10 μM pour l'ADP et un K_m de 1-150 μM pour l'ATP pour l'ANT du foie de rat. (Fioret et al., 1998) Durant le métabolisme aérobie, ces deux nucléotides sont en compétition pour le transport. Celui-ci n'est pas neutre au niveau des charges électriques, l'ATP possédant quatre charges négatives et l'ADP trois charges négatives. Comme conséquence du potentiel mitochondrial membranaire, l'ATP est préférentiellement exporté de la matrice. L'analyse structurale de l'ANT en présence d'un inhibiteur de l'ANT, le carboxyatractyloside (CAT), par cristallographie aux rayons X avec une résolution de 2.2 Å a été réalisée (Pebay-Peyroula et al., 2003). L'ANT seul n'a pu être cristallisé à ce jour. Le transport des nucléotides adényliques pourrait être associée à différents changements conformationnels à l'intérieur de chaque monomère de l'ANT.

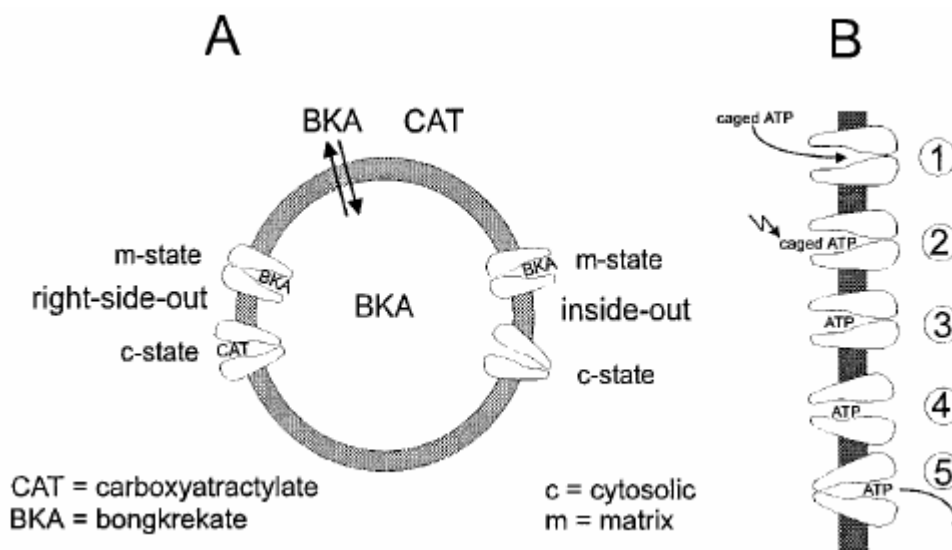
Fig. 6. Section à travers le transporteur. L'ANT possède une cavité conique où vient se fixer l'inhibiteur (en haut) (D'après Pebay-Peyroula et al., 2003).



L'ANT est exprimé par trois isoformes : ANT1, ANT2 et ANT3. Chez l'Homme, le bétail et la souris ANT1 est l'isoforme exprimée de manière prédominante dans les muscles cardiaque et squelettiques, ANT2 est ubiquitaire, exprimée dans tous les tissus en quantité variable en fonction de l'activité respiratoire du tissu. ANT3 a un faible niveau d'expression dans le cerveau, le foie, le rein, le cœur et les muscles squelettiques.

Pour les études du transport de nucléotides, deux types d'inhibiteurs spécifiques de l'ANT sont utilisés (Fig. 7). Le CAT se lie à l'ANT à l'extérieur de la membrane interne tandis que l'acide bongkrélique (BKA), un autre inhibiteur, se lie du côté interne de la membrane interne.

Fig. 7. L'inhibition de l'ANT par le carboxyatractyloside (CAT) et l'acide bongkrélique (BKA) et les 5 étapes du mécanisme. (A). La membrane est perméable au BKA qui inhibe le transporteur dans l'état ouvert du côté matriciel (m-state), tandis que CAT ne passe pas la membrane et inhibe le transporteur dans l'état ouvert du côté cytosolique (c-state). Les 2 états symbolisent l'orientation du site de fixation en respectant l'espace matriciel et le cytosol dans le système natif. **(B).** (1) diffusion à l'intérieur du canal, (2) fixation de l'ATP, (3) translocation, (4) dissociation et (5) diffusion à l'extérieur du canal (D'après Gropp et al., 1999)



L'ANT est apparue comme une protéine, qui, mis à part sa contribution à la translocation ADP/ATP, pouvait faire partie du pore de transition de perméabilité (PTP) non

seulement au niveau structural des sites de contact mais aussi à un niveau fonctionnel dans la régulation de la perméabilité de la membrane mitochondriale durant l'apoptose (Belzacq et al., 2002). Cette hypothèse est aujourd'hui écartée car des études sur des souris déficientes en ANT ont montré que cette protéine ne fait pas partie du PTP (Kokoszka et al., 2004).

1.4.2. Les canaux VDAC

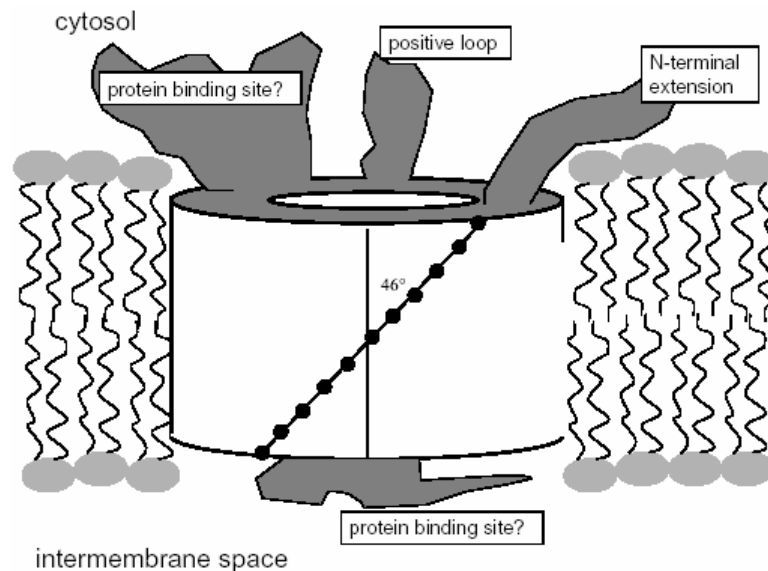
Le mécanisme commun pour la translocation de métabolites à travers la membrane externe mitochondriale est le VDAC (Colombini, 1979, Xu et al., 1999).

Le terme de porine mitochondriale souvent utilisé n'est pas approprié. En effet, l'évolution de VDAC n'est pas claire, des preuves expérimentales indiquent fortement que la structure et les propriétés de VDAC sont assez différentes des structures et propriétés variées de la famille des canaux bactériens appelés porines (Colombini, 2004). Les canaux VDAC sont présents dans les cellules de la plupart des organismes de *Escherichia Coli* à la pomme de terre et aux primates. Ce canal protéique est la protéine majoritaire de la membrane externe mitochondriale, comptant pour 60% des protéines totales de la membrane externe (Thinnes et al., 1990).

Le pore formé par la protéine est relativement petit, son poids moléculaire est d'environ 30 kD (Mannella et al., 1975, Mannella, 1982). VDAC forment des canaux à partir de feuilletts β (Fig. 8).

Fig. 8. Schéma de VDAC dans la membrane mitochondriale externe. Le cylindre qui traverse la membrane est composé d'une hélice α et de 13 feuilletts β . Les travées sont orientées à 46° de l'axe du pore. Les boucles entre les régions sont transmembranaires et sont probablement les sites d'interaction avec les protéines et d'autres facteurs solubles. Une boucle (inhabituelle mais conservée) du côté cytosolique est un candidat pour un site de fixation d'une protéine. Il y a aussi une boucle chargée très positivement dans quelques isoformes (incluant celles des mammifères) de VDAC. Alors que la longueur globale est hautement conservée, il y a des extensions N-terminales dans quelques

VDAC pouvant servir comme fonction de reconnaissance ou de site d'attachement. (d'après Colombini, 2004).



La sélectivité des porines envers les espèces anioniques dépend de la valeur et de la direction du potentiel membranaire. Comme cela a été montré avec des membranes de phospholipides reconstituées, les canaux sont ouverts pour les composés anioniques comme Cl^- , Pi et les nucléotides adényliques (Colombini, 1979, Colombini, 1994) pour des voltages inférieurs à 20-30mV (Vyssokikh et Brdiczka., 2004). Pour un voltage inférieur à 30 mV (état de conductance élevé) le pore a un diamètre de 4 nm. Au-delà de 30 mV (état de conductance faible), le diamètre du pore est réduit à 2 nm. Les variations de conductance dépendantes du voltage sont certainement liées aux modifications structurales du VDAC.

La famille de gènes de VDAC chez les mammifères, consiste en trois isoformes (VDAC1, VDAC2 et VDAC3), chacune d'entre elles partageant approximativement 70% d'homologie de séquence avec les deux autres membres de la famille. Chez l'Homme, cinq gènes codants pour VDAC ont été trouvés mais seulement trois isoformes sont exprimées (Decker et Craigen., 2000, Winkelbach et al., 1994). Chez la souris, la délétion d'une au moins de ces 3 isoformes de VDAC a de sérieuses conséquences mais la viabilité cellulaire ne requiert pas une isoforme unique (Wu et al., 1999). La délétion en VDAC chez la souris mâle entraîne une stérilité due à des spermatozoïdes non mobiles (Sampson et al., 2001) alors que la délétion soit en VDAC1 ou VDAC2 produit des souris avec une capacité respiratoire réduite de 30% (Wu et al., 1999). Le manque de VDAC1 a pour conséquence une mort

embryonnaire de quelques souris mais plus fréquemment la mort embryonnaire apparaît chez des souris déficientes en VDAC1 et VDAC3 (Colombini, 2004). L'absence de VDAC1 dans les muscles squelettiques d'un enfant souffrant d'une sévère encéphalomyopathie mitochondriale suggère que les VDACs jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme énergétique (Huizing et al., 1996).

On a longtemps pensé que le rôle des canaux VDAC est de limiter la dislocation des composés de poids moléculaire élevé (>3-10 kDa) (Benz, 1990). Cette approche a changé maintenant car il a été montré par plusieurs études que la régulation des canaux VDAC jouerait un rôle important dans la régulation de la fonction mitochondriale (Liu et Colombini., 1992, Hodge et Colombini., 1997, Vander Heiden et al., 2000).

Une protéine soluble appelée le modulateur de VDAC (ou VDAC modulator) isolé à partir de mitochondries est capable de moduler la perméabilité de VDAC. Cette protéine a été tout d'abord découverte chez *Neurospora crassa* et ensuite dans d'autres espèces telles que les eucaryotes. Le rôle de ce modulateur reste à ce jour inconnu (Liu et Colombini., 1992, Liu et al., 1994). Dans certains tissus (foie, cerveau) VDAC agit donc à la périphérie des mitochondries comme un site de liaison pour des enzymes telles que l'hexokinase (Fiek et al., 1982, Nakashima, 1989) et la glycérol kinase (Ostlund et al., 1983, Towbin et al., 1989), indiquant de possibles connections entre la fonction des canaux de porines et la synthèse d'ATP glycolytique.

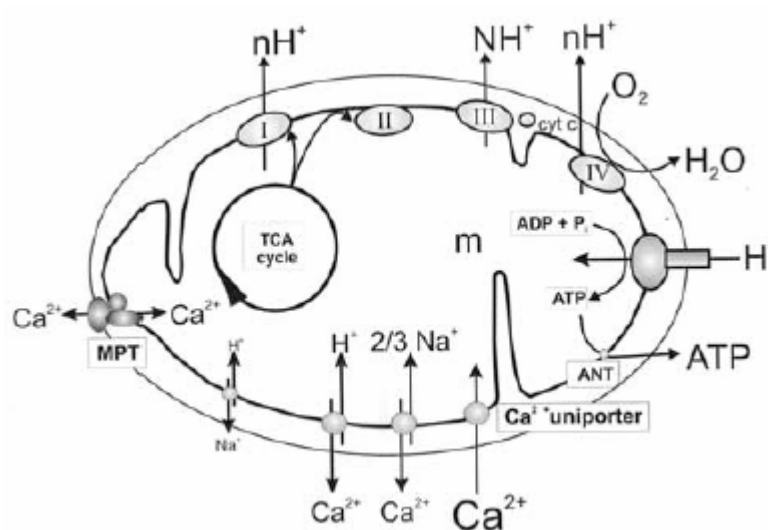
VDAC est associé avec l'initiation de la phase mitochondriale de l'apoptose (Bernardi et al., 2001, Vander Heiden et al., 2000). Quelques chercheurs ont rapproché VDAC de la structure du pore de transition de perméabilité, mais d'autres ont proposé (Halestrap et al., 2002) que VDAC pourrait le moduler sans être structuralement impliqué.

1.5. Le calcium mitochondrial

Les mitochondries importent le calcium du cytosol par un uniport électrophorétique énergisé par le potentiel membranaire négatif maintenu par la chaîne respiratoire mitochondriale. Cet uniport est bloqué de manière compétitive par les concentrations physiologiques de Mg^{2+} . Dans les conditions normales de la vie cellulaire, le calcium est maintenu dans la mitochondries en état dynamique, et est continuellement relargué par l'antiport Ca^{2+}/Na^{+} . Cet échangeur opère avec une stoechiométrie de $3 Na^{+}/1 Ca^{2+}$, son K_m pour le Na^{+} est de 8-10 mM et sa V_{max} de 18 nmol $Ca^{2+}/min/mg$ protéines dans le cœur

(Martonosi et Pikula., 2003). Ce cycle du calcium régule trois déshydrogénases de la matrice nécessaires pour le cycle de Krebs et donc, en aval, à la production d'ATP (Carafoli, 2004).

Fig. 9. Transport du Ca^{2+} dans la mitochondrie. Schéma simplifié d'une mitochondrie avec les principaux éléments de la chaîne de transport d'électrons et les voies proposées pour les influx et les efflux de Ca^{2+} . Le $\Delta\Psi_m$ fournit la force proton motrice pour la phosphorylation de l'ADP par la FoF1 ATPase. Le captage électrophorétique du Ca^{2+} via l'uniport est dépendant du $\Delta\Psi_m$, et l'abolition du potentiel abolit le captage mitochondrial du Ca^{2+} . Le Ca^{2+} ressort par l'antiport $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$. Le pore de transition de perméabilité mitochondrial (MPT) est un large canal composé de plusieurs protéines (d'après Jacobson et Duchen., 2004).



A.2. La consommation d'ATP

A.2.1. Appareil contractile - cycle contractile

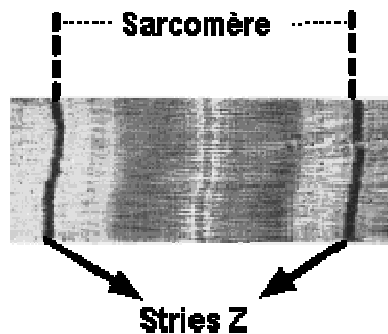
L'unité fonctionnelle du muscle strié, comme le muscle cardiaque et le muscle squelettique, est le sarcomère dont les limites sont formées par les disques Z (ou Z lines). Les sarcomères sont représentés par un motif de filaments fins alignés latéralement avec les filaments épais.

2.1.1. Les myofilaments

Les myofilaments de la machinerie contractile de la cellule sont responsables de la transduction du signal énergétique chimique en travail et en énergie mécanique. Ils occupent 45-60% du volume cellulaire dans les ventricules de mammifères (Bossen et al., 1978, Forbes et Sperelakis., 1995 page 1978).

Les myofilaments sont composés d'épais (myosine) et de fins (actine) filaments ainsi que d'éléments contractiles associés et des composants du cytosquelette (Fig. 10).

Fig.10. Photographie d'un sarcomère.



Les filaments épais de myosine font environ 1.6 μm de long et 15 nm d'épaisseur. Chaque filament épais est composé d'environ 300 molécules de myosine. La myosine est en forme de 'Y' constituée d'une longue queue et portant deux têtes flexibles à une extrémité. La tête flexible possède un site de liaison à l'actine et un site de fixation pour l'ATP, c'est elle qui est responsable de l'aspect moteur de la protéine, la queue ayant une fonction d'ancrage. Les têtes de myosine (connues comme les myosines ATPases) dépassent le long de l'axe tous les 14.3 nm, avec un angle tournant de 120° à chaque point.

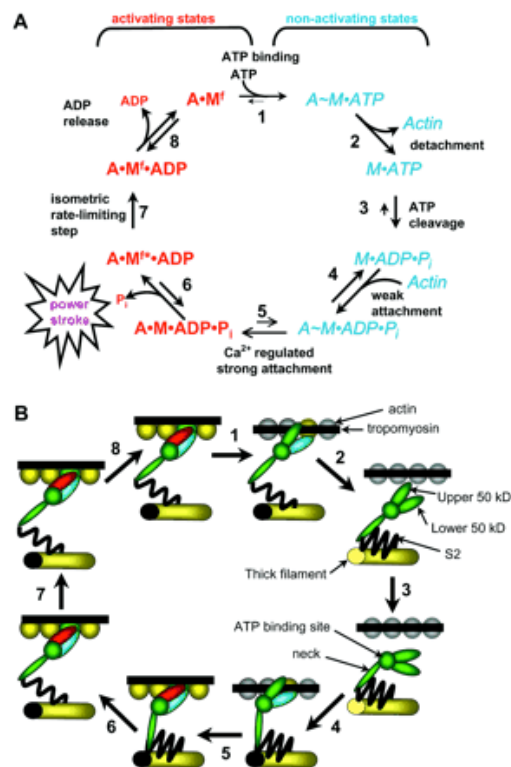
2.1.2. La contraction du muscle strié

Les têtes de myosine établissent des ponts union (ou croisés, crossbridges) qui interagissent avec l'actine pour générer la contraction. Lorsque la $[\text{Ca}^{2+}]$ cytoplasmique s'élève, les myofilaments sont activés de manière Ca^{2+} dépendante, traduisant de ce fait l'énergie chimique (ATP) en force mécanique de contraction.

Bien que les modes de régulation soient très diversifiés, le fonctionnement de tous les types de myosine est similaire. La fixation d'une molécule d'ATP entraîne le détachement entre l'actine et la myosine et l'hydrolyse de l'ATP provoque un mouvement au niveau de l'articulation de la tête de myosine. L'ADP et le Pi permettent une faible interaction de la tête de myosine avec une nouvelle molécule d'actine. En présence de calcium, la tête de myosine s'accroche fortement au filament d'actine. La libération du Pi entraîne la contraction en changeant la conformation de la tête de myosine qui peut alors glisser sur le filament d'actine. A la fin du mouvement, la molécule de myosine a glissé le long du filament d'actine. Le sens d'accrochage du filament d'actine par rapport à la myosine est polarisé. Pour que le mouvement ait lieu, il est indispensable que les deux éléments actine et myosine soient orientés de manière correcte.

Un modèle physique de cette transduction est connu, il s'agit de la théorie des filaments glissants. Elle est apparue à partir des études de diffraction aux rayons X (Huxley, 1969) et de perturbation mécanique (Huxley et Simmons., 1971). Les étapes chimiques impliquant le cycle de crossbridges ont été intensivement caractérisées et corrélées avec les schémas physico-mécaniques (Goldman, 1987; Brenner, 1987). Bien que le cycle soit le même pour les muscles squelettiques et cardiaque, les constantes contrôlant les transitions intermédiaires des crossbridges sont différentes.

Fig. 11. Le mécanisme du cycle de crossbridge. (A): Il est composé de 8 étapes. Une liaison forte est désignée par "•" et une faible liaison par "~". A, actine; M, myosine; P_i, phosphate inorganique. Le cycle commence en haut, avec un crossbridge attaché fortement à l'actine (A•M^f, où f est la force du crossbridge) et son « cou » est en position étendue (voir B). (B): Le cycle de contraction et les changements structuraux associés. Il n'y a aucune interaction lorsque l'actine est en grise et la myosine en verte, un interaction faible quand A est en jaune et M en bleue et enfin une forte interaction est montrée par une A verte et une M rouge. (D'après Gordon et al., 2001)



Les crossbridges s'attachent et exercent une force constante pendant les étapes 6, 7, 8 et 1 (contraction isométrique) et la force diminue jusqu'à zéro quand les crossbridges se séparent à l'étape 2. Pendant les contractions isotoniques les filaments glissent les uns sur les autres, la contrainte sur le crossbridge est réduite et l'étape 7 arrive plus rapidement. Le mécanisme mécano-chimique de la Fig. 13 implique que durant la contraction isométrique, un crossbridge reste fortement attaché à l'actine pour un temps relativement long (>100 ms/cycle).

Le mouvement de la tête de myosine induit par l'ATP n'a pas été observé dans les filaments dont l'activité ATPase des têtes de myosine a été éliminée. L'addition d'ADP n'a pas produit un mouvement appréciable des têtes de myosine. Les résultats de Sugi et al. (Sugi et al., 1997) ont montré que le mouvement de la tête de myosine induit par l'ATP se produit en absence de filaments fins. L'étape limitante est le relargage des produits de l'hydrolyse de l'ATP. L'hydrolyse de l'ATP en ADP et P_i nécessite des ions Mg^{2+} .

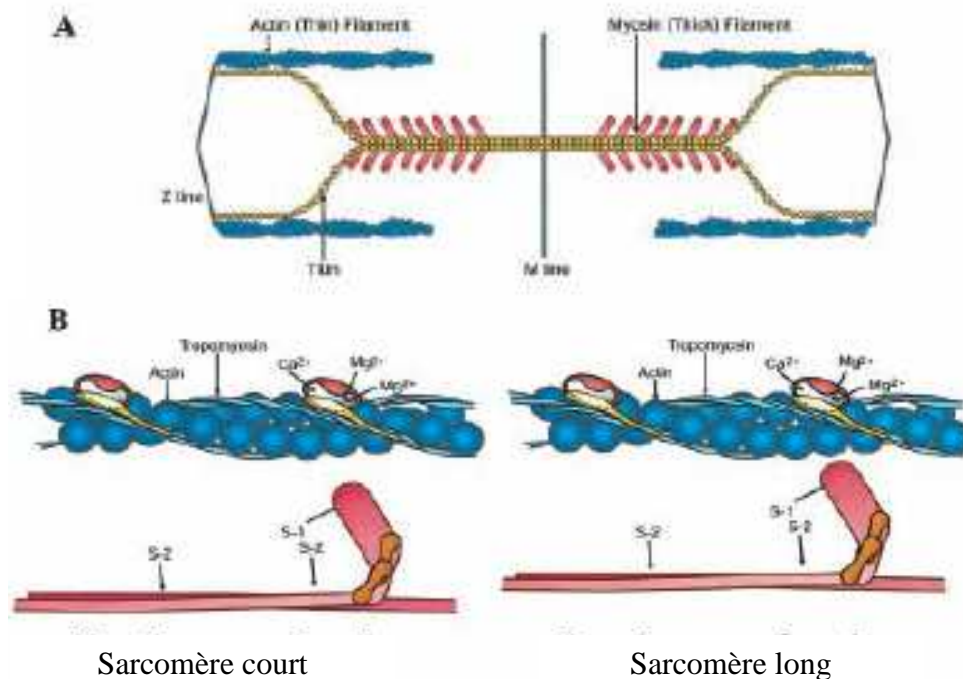
Depuis longtemps, il est connu que les différents types de muscles squelettiques ont des propriétés contractiles variées. Selon la théorie classique de Barany (Barany, 1967), la myosine des muscles rapides possède une activité ATPase plus élevée et catalyse donc une déplétion plus rapide en ATP. En revanche, la myosine des muscles lents, comme le cœur, a une activité ATPase plus faible donc une diminution de l'ATP plus lente.

La longueur du sarcomère affecte la force maximum et la sensibilité de la force au Ca^{2+} dans les muscles cardiaque et squelettiques. Le Ca^{2+} intracellulaire se fixe sur le site spécifique de la troponine C (TN-C). Cette fixation modifie la conformation de la molécule de tropomyosine, libérant ainsi les sites de fixation spécifiques de la myosine présents sur la molécule d'actine. Dans le même temps, la fixation du Ca^{2+} sur la TN-C permet la levée de l'inhibition exercée par la troponine I (TN-I) sur l'activité ATPasique de la tête de myosine. La dépendance de la tension maximum tétanique dans le muscle squelettique, en particulier sa diminution pour des sarcomères de grande taille, a été utilisé pour appuyer le modèle de crossbridge de la contraction musculaire (Gordon et al., 1966), tandis que sa diminution pour des sarcomères de courte taille a été moins précisément expliqué. La relation force-longueur est d'une importance capitale dans le muscle cardiaque car le cœur fonctionne normalement dans la gamme de longueur du sarcomère, donnant ainsi naissance à la relation de Frank-Starling.

L'hypothèse fondamentale est que la force maximale est déterminée, quelle que soit la longueur du sarcomère, par le degré de superposition des filaments fins et épais (le nombre de crossbridges). Dans les myofibrilles, composées de plusieurs unités sarcomériques, les filaments de titine forment un réseau filamenteux contigu. Il y a trois à six molécules de titine associées avec chaque filament épais dans chaque moitié d'un sarcomère dans les muscles de vertébrés (Squire, 1997). La titine interagit directement avec plusieurs protéines associées aux filaments épais (la protéine C liant la myosine, la protéine H liant la myosine, la protéine M, la myomésine et la tige de la chaîne lourde de myosine). La titine interagit donc directement avec les filaments d'actine près des disques Z et avec des composants des disques Z : l' α -actinine et la « T-cap » (téléthonine). D'après Granzier et ses collègues, la titine est dirigée radialement plutôt qu'axialement afin d'augmenter la force au repos pour de grandes longueurs qui approcheraient en fait les filaments fins et épais plus près les uns des autres pour faciliter les ponts union, ou crossbridges, (Cazorla et al., 2001). Une autre possibilité est que la contrainte de la titine altère l'emballage de la myosine dans les filaments épais ou l'orientation des têtes de myosine le long de l'épine dorsale du filament épais. La diminution de la contrainte de la titine, réduit la sensibilité au calcium et la dépendance longueur- force du myocarde.

Fig. 12. Sarcomère et myofilaments myocardiques. (A) Schéma d'un sarcomère montrant les relations spatiales des filaments fins et épais et les interactions putatives de la titine avec les filaments,

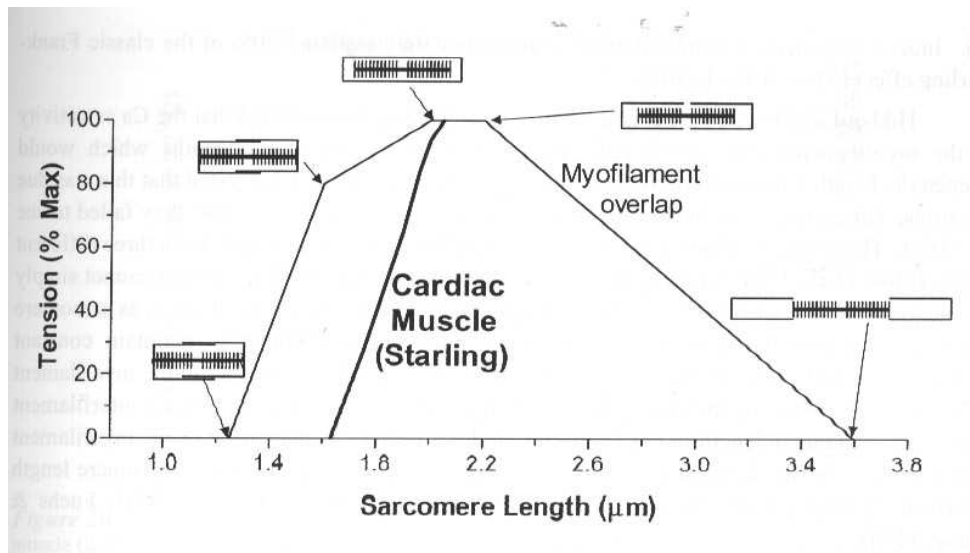
qui donneraient naissance aux forces radiales et axiales quand le sarcomère est étiré. **(B)** Schéma des filaments fins et épais illustrant la diminution de la séparation latérale pour des grandes longueurs. La probabilité d'interaction en pont union (ou crossbridge) augmente pour des grandes longueurs due à la plus grande proximité vis-à-vis de l'actine (d'après Moss, 2002).



Par ailleurs, l'élévation de la sensibilité au Ca^{2+} augmente avec la longueur des sarcomères dans le muscle cardiaque et squelettique. Cet effet est meilleur dans le muscle cardiaque et contribue à une meilleure activation dépendante de la longueur du sarcomère, augmentant la relation de Frank-Starling.

Fig. 13. La relation de Frank-Starling et plus généralement la relation force-longueur.

Relation force-longueur décrite dans le muscle squelettique de grenouille par Gordon et al. (1966). Celle pour le cœur de chat (Allen et al., 1974) est illustrée dans la gamme des longueurs physiologiques des sarcomères (tracé épais). (D'après Bers, 2002).



La diminution de la sensibilité au Ca^{2+} parallèlement à la diminution de la longueur du sarcomère peut être plus facilement expliquée par l'augmentation de la distance entre les filaments fins et épais.

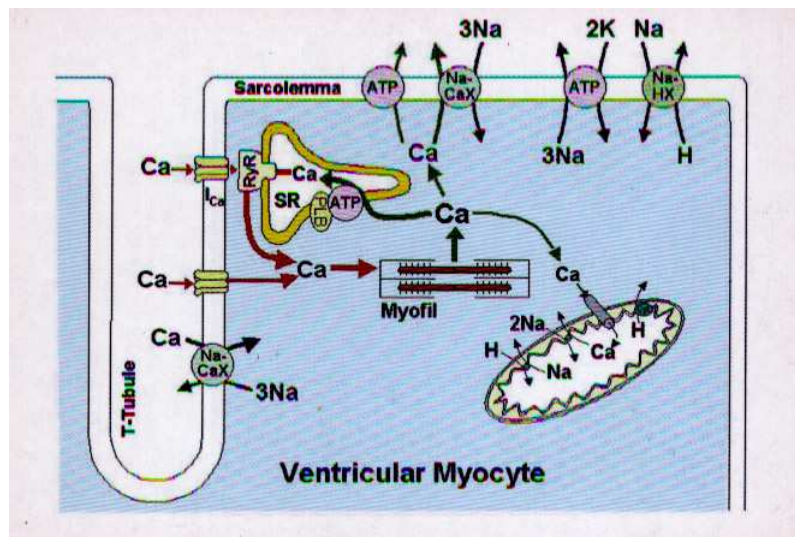
Le mécanisme par lequel le Ca^{2+} active la contraction est bien établi (Solaro et Rarick., 1998, Zot et Potter., 1987). Des mesures directes de la $[\text{Ca}^{2+}]$ libre dans les cellules cardiaques sont nécessaires pour la compréhension de la régulation de la contractilité. Les variations cycliques des ions Ca^{2+} cytosoliques sont aussi appelées flux de Ca^{2+} . Dans le ventricule quiescent, les mesures de viabilité cellulaire ont donné une concentration moyenne en Ca^{2+} libre de $0.26 \mu\text{M}$, pendant les contractions les flux de Ca^{2+} atteignent $10 \mu\text{M}$ (Marban et al., 1980). Des améliorations dans les techniques pour la mesure du Ca^{2+} intracellulaire suggèrent une concentration diastolique aux environs de 10^{-7} M , et un pic systolique jusqu'à 10^{-5} M dépendant de l'état contractile du myocarde (Opie, 1998). En présence d'une $[\text{Ca}^{2+}]$ suffisante la myosine peut interagir avec l'actine ce qui augmente la capacité d'hydrolyse de l'ATP par la myosine ATPase.

A.2.2. Cycle du Ca^{2+} cytoplasmique

Les changements dans la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracellulaire jouent un rôle critique dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires allant de la contraction musculaire jusqu'au neurotransmetteur et à la sécrétion hormonale jusqu'à la transcription des gènes. Il existe un gradient de la $[\text{Ca}^{2+}]$ libre entre les compartiments cellulaires et subcellulaires délimités par une membrane. On trouve ce gradient à travers la membrane sarcolemmale et celle du RS.

L'ordre de magnitude est de 10^4 : 1 mM de $[Ca^{2+}]$ libre dans le RS et 100 nM dans le cytosol. La $[Ca^{2+}]$ libre cytosolique est maintenue activement à un niveau aussi faible par un système de mécanismes régulant l'homéostasie du Ca^{2+} (Wang, 2004).

Fig. 14. Schéma général du cycle du Ca^{2+} dans le myocyte ventriculaire. Le Ca^{2+} entre via les canaux calciques (I_{Ca}) et l'échange Na/Ca (NaCaX). L'influx de Ca^{2+} contrôle le relargage de Ca^{2+} du RS par le récepteur à la ryanodine (RyR). Le Ca^{2+} est enlevé des myofilaments (Myofil) et du cytosol par les pompes SERCA du RS (modulées par le phospholamban, PLB), les pompes Ca-ATPases sarcolemmales, l'échangeur Na/Ca et l'uniport mitochondrial (Mito). (d'après Bers, 2002).



Le mécanisme du couplage excitation-contraction ('EC coupling') implique des changements cycliques de la concentration intracellulaire des ions Ca^{2+} libres dans les cellules cardiaques; les mitochondries participant activement dans ce processus. Ainsi, le couplage excitation-contraction lie l'excitation électrique à l'activité mécanique des cellules cardiaques (le degré d'activation contractile dépend de la quantité de Ca^{2+} délivrée aux myofilaments). Ce couplage est initié par l'influx de Ca^{2+} dans les cardiomyocytes via les canaux calciques voltage dépendants de type-L du sarcolemme (récepteurs à la dihydropyridine, DHPR) activés lors de chaque potentiel d'action cardiaque. Ce Ca^{2+} qui entre dans la cellule peut directement contribuer à l'activation du relargage de Ca^{2+} des réservoirs de Ca^{2+} intracellulaires du RS. Ce processus très bien décrit est le 'Calcium-induced Calcium-release' (CICR). Ce relargage secondaire de Ca^{2+} se produit à partir de larges canaux homotétramériques de relargage du

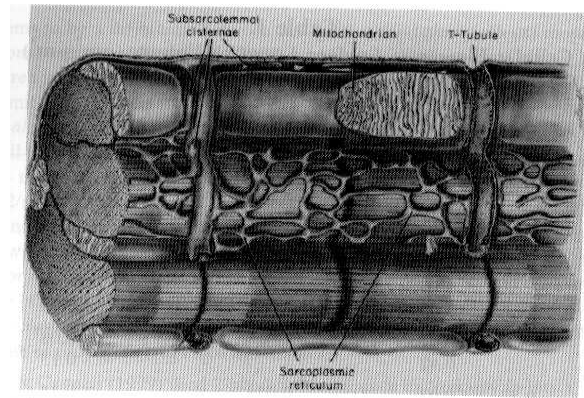
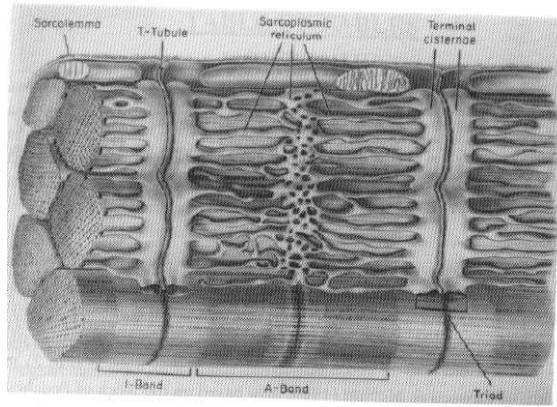
Ca^{2+} (récepteurs à la ryanodine, RyR) situés dans la membrane du RS. Dans la plupart des espèces mammifères, le CICR amplifie ainsi plusieurs fois le signal initial (Niggli, 1999a).

2.2.1. Structures intracellulaires contrôlant les niveaux de Ca^{2+} cytoplasmique

Le sarcolemme joue un rôle important dans le contrôle du Ca^{2+} cytoplasmique. Il est le site d'entrée et de sortie du Ca^{2+} cellulaire. En effet, des vésicules isolées de tubules T de muscles squelettiques ont de très fortes densités en récepteurs à la dihydropyridine (DHPR), qui sont les canaux calciques de type-L (Jorgensen et al., 1989 ;Wibo et al., 1991). Les jonctions du RS avec le sarcolemme dans les muscles striés sont hautement spécialisées et forment des structures pontées appelées « pieds » (Franzini-Armstrong, 1972), des structures similaires sont observées dans le muscle cardiaque (Frank, 1990). Ces « pieds » ont été identifiés comme des canaux de relargage de Ca^{2+} (récepteurs à la ryanodine, RyR) (Inui et al., 1987a, 1987b).

Dans les muscles squelettiques, les cellules possèdent un réseau de réticulum sarcoplasmique (RS) très étendu avec de larges citernes terminales aboutissant aux tubules T. En revanche, le muscle cardiaque a un système de RS plus clairsemé et moins rigide avec des tubules T aux diamètres plus grands (Bers, 2002). (Fig. 15).

Fig. 15. Représentations schématiques des tubules-T et du RS associés à plusieurs myofibrilles. (A) Muscle squelettique de grenouille. Chaque myofibrille est entourée d'un réseau de SR. Dans le muscle squelettique de mammifère, les tubules-T et les triades sont situés normalement à la jonction bande A-I. (B) Muscle cardiaque de mammifère. Comparé au muscle squelettique, les tubules-T cardiaques sont plus larges en diamètre et le RS plus dispersé. Les mitochondries sont plus grosses et les myofibrilles plus irrégulières dans le cœur. (d'après Fawcett et Nutt., 1969).



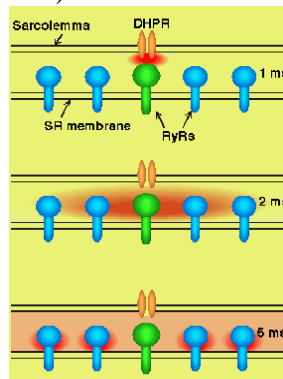
Dans les myofibrilles, le RS est très élargi au niveau des citernes terminales lui permettant un contact des 2 côtés avec les tubules T pour former les triades au niveau des disques Z. Dans les muscles squelettiques de mammifères, les tubules T et les triades sont situés à la jonction bande A- bande I (Fawcett et McNutt., 1969). La surface du sarcolemme est physiquement continue avec la membrane du tubule T et les deux se combinent pour former une barrière perméable entre les milieux intracellulaire et extracellulaire. Le volume du RS varie selon les types cellulaires et il se trouve en quantité plus abondante dans les muscles squelettiques (Eisenberg et al., 1974; Eisenberg et Kuda., 1975; Eisenberg et Kuda., 1976) que dans le cœur de mammifères (Bossen et al., 1978; Forbes et Sperelakis., 1995).

2.2.2. Ca^{2+} sparks et Ca^{2+} quarks

Une petite fuite de Ca^{2+} du RS vers le cytoplasme peut se produire au repos peut être via les canaux de relargage du Ca^{2+} du RS. Récemment, il a été reconnu que ces signaux de relargage de Ca^{2+} du RS, sont les sommations d'événements élémentaires de relargage: les ' Ca^{2+} sparks'. L'observation de ces ' Ca^{2+} sparks' montrent qu'ils peuvent se produire soit individuellement ou prendre la forme d'un flux homogène de Ca^{2+} se propageant comme des vagues de Ca^{2+} le long de la cellule cardiaque. Le laboratoire de Niggli a observé des événements de relargage de Ca^{2+} plus petits que les Ca^{2+} sparks, appelés Ca^{2+} quarks, se produisant à l'ouverture d'un seul canal de relargage du Ca^{2+} du RS (RyR) (Fig. 16 et Niggli, 1999b).

Fig. 16. Ca^{2+} sparks et Ca^{2+} quarks cardiaques. A $t = 1$ ms, un canal Ca^{2+} de type-L, situé dans le plasmalemme s'ouvre et du Ca^{2+} entre dans la fente (15 nm de large). Ceci déclenche presque immédiatement le relargage de Ca^{2+} depuis RyR (faible sensibilité) ce qui génère un flux élevé de Ca^{2+} du RS dans la fente ($t = 2$ ms). La propagation du Ca^{2+} dans la fente entraîne un certain nombre de

Ca²⁺ quarks des RyR (forte sensibilité, faible flux) qui contribuent à la transformation des Ca²⁺ quarks en sparks (t = 5 ms). (d'après Niggli, 1999a).

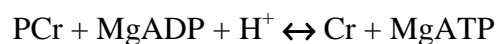


Parallèlement à la Mg,Ca-ATPase du RS (SERCA), il existe d'autres structures utilisatrices d'ATP comme les ATPases du sarcolemme. Il existe donc un système de transfert des molécules de haute énergie de leur lieu de production (la mitochondrie) vers leurs lieux d'utilisation (myofibrilles notamment). En effet, le danger est l'accumulation d'ADP au niveau des ces ATPases, il est donc nécessaire de régénérer rapidement l'ATP.

A.3. Transfert d'énergie par la navette de la créatine kinase et les problèmes de sa régulation

A.3.1. Les Créatine kinases

Les créatine kinases (CK) sont des guanidino kinases qui catalysent le transfert réversible d'un résidu phosphate de haute énergie entre l'ATP et la créatine (Cr), générant ainsi de l'ADP et un transporteur de liaison phosphate riche en énergie: la phosphocréatine (PCr). La réaction a été découverte par Karl Lohmann (Lohmann, 1934) :



La réaction de la CK joue un rôle central dans le transfert énergétique cellulaire. Les isoenzymes de la CK, localisées à des sites spécifiques de production et d'utilisation de l'ATP sont liées par la navette PCr/Cr dans les cellules à fortes demandes énergétiques. La famille des CK est codée par quatre gènes indépendants, chacun codant pour une forme monomérique différente. Les isoformes de la CK sont classiquement divisées en 2 groupes : isoformes mitochondriales (MiCK ou MtCK) et cytosoliques (isoformes musculaire MCK et cérébrale

BCK). Dans le cytosol, les CK sont présentes sous forme de dimères. L'expression des CK cytosolique est finement régulée durant le développement : BCK prédomine dans les tissus embryonnaires et diminue dans la période post-natale créant donc un basculement vers l'isoforme MCK (Trask et Billadello., 1990). MCK est 'uprégulée' dans les tissus sarcomériques après la naissance (Payne et Strauss., 1994). Chez les mammifères et les oiseaux, les 2 isoformes cytosoliques tissu-spécifiques peuvent être distinguées par une forme ubiquitaire BB-CK, exprimée fortement dans le cerveau et une forme musculaire spécifique, MM-CK, exprimée fortement dans les muscles striés (Eppenberger et al., 1964; Eppenberger et al., 1967). Quatre résidus de lysine sont hautement conservés dans l'isoforme MM-CK, sans doute responsables de l'interaction de la MM-CK avec la bande M (Brdiczka et Wallimann., 1994).

L'activité des isoformes des CK diminue dans l'ordre suivant : muscle squelettique rapide, muscle squelettique lent, muscle cardiaque mais l'activité de la MiCK augmente elle dans le même ordre et son activité atteint 30-40% de l'activité de l'enzyme totale dans le cœur (Saks et al., 1974; Iyengar, 1984; Yamashita, 1991). Les isoenzymes couplées des CK fonctionnent via un mécanisme de couplage fonctionnel (canalisation métabolique) mais dans différentes directions suivant leur localisation.

Tandis que les CK cytosoliques utilisent principalement la PCr pour reproduire de l'ATP aux sites de consommation d'énergie, tels que la myosine ATPase myofibrillaire dans les muscles (Wallimann et al., 1984 ; Ventura-Clapier et al., 1994) et la Ca²⁺-ATPase du RS (Rossi et al., 1990 ; Minajeva et al., 1996), l'isoforme mitochondriale est principalement responsable du turnover de l'ATP, qui est exporté hors de la matrice mitochondriale par l'ANT, pour la production de PCr (Klingenberg, 1993). L'isoforme mitochondriale ubiquitaire (uMiCK) est exprimée dans les intestins, le cerveau, les reins, le placenta et très faiblement dans l'aorte et les tissus sarcomériques. La seconde isoforme de MiCK est la MiCK sarcomérique (sMiCK), exclusivement exprimée dans le cœur et les muscles squelettiques.

Le système couplé ANT-MiCK est un excellent exemple de couplage de complexes supramoléculaires d'enzymes et de transporteurs, pouvant être décrit par la formule suivante (Saks et al., 2004) :

Couplage Fonctionnel = Canalisation Métabolique + Microcompartimentation

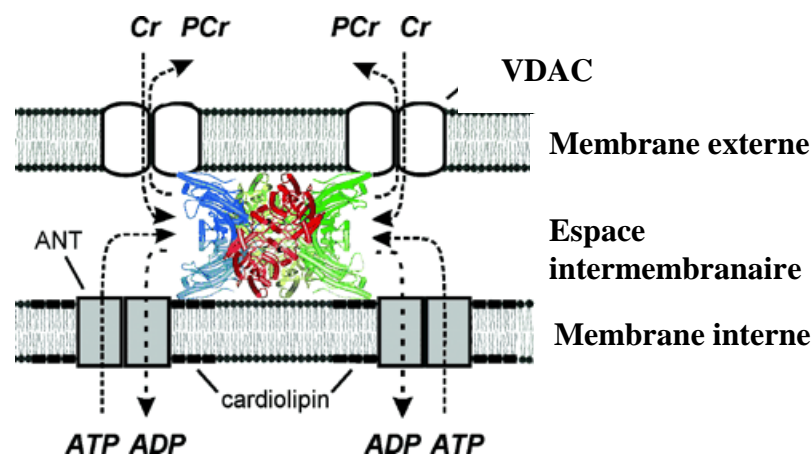
A.3.2. Phénomène de couplage fonctionnel

3.2.1. Couplage fonctionnel entre créatine kinase mitochondriale et adénine nucléotide translocase

L'isoforme mitochondriale de la CK (MiCK) est localisée dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Wyss et al., 1992 ;Scholte, 1973). Elle est connue pour se lier fortement à la surface externe de la membrane interne mitochondriale par les cardiolipines proche de l'ANT (Saks et al., 1975 ; Jacobus et Lehninger., 1973 ; Jacobus, 1985 ; Muller et al., 1985 ; Barbour et al., 1984). Les cardiolipines sont situées dans la membrane interne mitochondriale et lient l'ANT. Elles servent de sites de contact (ou « contact sites ») pour la MiCK (Fig. 17).

Contrairement aux isoformes cytosoliques, MiCK peut apparaître sous la forme de dimères ou d'octamères, ces derniers étant assemblés à partir de dimères. Les octamères de MiCK peuvent former des liaisons stables entre les membranes externes et internes, induisant ainsi des sites de contact *in vitro* (Rojo et al., 1991).

Fig. 17. MiCK dans les sites de contact mitochondriaux. Un modèle de topologie de la MiCK, de l'ANT, et de VDAC dans les sites de contact périphériques, où la MiCK lie les membranes mitochondriales externe et interne. Noter l'interaction directe de la MiCK avec VDAC et les cardiolipines, aussi bien que sa proximité avec l'ANT. Les chemins des substrats et des produits sont indiqués. Cr, créatine; PCr, phosphocréatine. (modifié d'après Schlattner et al., 2004).



Trois lysines C-terminales déterminent la haute affinité d'interaction sMiCK/cardiolipines et son effet sur la structure de la MiCK, alors qu'une faible affinité de liaison et d'autres effets sur la fluidité membranaire dépendent d'autres composants structuraux (Schlattner et al., 2004). L'architecture des complexes protéiques peut être différente selon leur localisation : dimère ou octamère de la MiCK en complexe avec l'ANT (Wallimann et al., 1992). Le point de vue du groupe de Wallimann ainsi que d'autres auteurs va dans le sens d'une forme octamérique pour la MiCK dans le cœur (Wallimann et al., 1992; Wyss et Kaddurah-Daouk., 2000). Un lien direct entre la forme octamérique de la MiCK et la forme tétramérique de l'ANT impliquant les cardiolipines a été initialement proposé par Schnyder et Wallimann (Schnyder et al., 1994) mais la stoechiométrie MiCK:monomère d'ANT s'est révélée être 1:2 (Kuznetsov et Saks., 1986). Une forte preuve en faveur de cette stoechiométrie 1:2 et la possibilité d'une proximité structurale entre la MiCK et l'ANT, a été apportée lors du travail dans lequel les MiCK de mitoplastes (mitochondries dépourvus de membrane externe mitochondriale) ont été traitées par des anticorps inhibiteurs ou non de la MiCK (Saks et al., 1987). Les anticorps non inhibiteurs de lapin avec une forte affinité pour la CK mitochondriale de rat n'ont inhibé ni l'activité de la MiCK ni de la phosphorylation oxydative, contrairement aux anticorps inhibiteurs. Ces données montrent l'arrangement spatial spécifique de la MiCK et de l'ANT dans les mitochondries.

Une propriété importante du système des CK est que son activité totale, la distribution de ses isoformes et la concentration en substrats guanidiques sont fortement variables selon les tissus et les espèces. Dans les cellules musculaires adultes, hautement organisées, les isoenzymes spécifiques des CK sont liées aux compartiments intracellulaires et sont fonctionnellement couplées aux enzymes impliqués dans la production et l'utilisation d'ATP ainsi qu'au transfert d'énergie. Les muscles squelettiques, sont incapables de maintenir un niveau constant de PCr durant des contractions continues de grande intensité (tétanos) et

l'instabilité métabolique qui se développe conduit à la fatigue musculaire. Pendant la période de repos, la dette en oxygène est réglée grâce à l'activation de la respiration mitochondriale, la PCr revient à son niveau initial par sa synthèse prédominante via le couplage ANT-MiCK, utilisant le fort rapport PCr/Cr caractéristique d'un retour à l'état de repos (Saks et al., 1977 ; Walsh et al., 2001b ; Mahler, 1985 ; Greenhaff, 2001). Au contraire dans le myocarde, les niveaux d'ATP et de PCr ne changent pas (phénomène de stabilité métabolique), et le rôle de la MiCK dans la régulation de la respiration est plus important grâce au couplage avec l'ANT (Kupriyanov et al., 1980 ; Saks et al., 1977 ; Walsh et al., 2001b ; Mahler, 1985).

Gellerich a proposé que le couplage fonctionnel pouvait être amélioré en contrôlant la perméabilité de VDAC sur la membrane externe en changeant la pression oncotique (Gellerich et al., 1994). Ceci pourrait être important en conditions *in vivo*.

3.2.2. Couplage fonctionnel entre créatine kinase MM et Mg ATPases

La fraction de CK liée à la bande-M est fonctionnellement couplée à l'ATPase myofibrillaire activée par l'actine (Wallimann et al., 1984 ; Ventura-Clapier et al., 1994). Seule l'isoforme musculaire spécifique MM-CK, mais pas son homologue BB-CK, est capable d'interagir avec cette structure sarcomérique (Stolz et Wallimann., 1998). Hornemann (2003) a montré pour la première fois de manière non équivoque la forte interaction entre MM-CK et la myoméline et la protéine-M (fortement homologue de la myoméline). Bien que les domaines de titine montrent un fort degré de similitude avec les domaines de la myoméline et de la protéine-M, la titine purifiée n'interagit pas avec la MM-CK. Les CK cytosoliques, en relation étroite avec les pompes calciques, jouent un rôle crucial dans l'énergétique de l'homéostasie du Ca^{2+} (Wallimann et al., 1998). En 1962, Yagi et Mase ont montré dans un système reconstitué que la constante de Michaelis-Menten de l'ATPase était de 1 à 2 ordres de magnitude plus faible lorsque la CK était associée à la myosine modifiant le K_m de 300 à 7 μM . Ils ont alors proposé que la concentration en substrat près du site actif de l'ATPase serait plus élevée que la concentration moyenne dans le milieu de réaction (Yagi et Mase., 1962). Saks et ses collègues, ont montré que les ATPases étaient fortement liées aux CK pour rephosphoryler rapidement l'ADP issu des ATPases (Saks et al., 1976). L'isoenzyme de CK liée à la membrane plasmique des cellules cardiaques est identique à la MM-CK et, est capable de rephosphoryler l'ADP formé dans la réaction de la Na,K-ATPase. Cette conclusion est basée sur l'observation que le taux de doublement de la PCr dans les préparations de membranes plasmiques est sensible à l'ouabaine (inhibiteur de la Na,K-

ATPase) et est déterminé par les paramètres cinétiques à la fois des NaK-ATPases et des CK de la membrane plasmique (Saks et al., 1976). Bessmann et ses collègues ont montré en utilisant le phosphate radioactivement marqué que l'ATP formé à partir de la PCr à travers les réactions des CK atteint le site actif de l'ATPase plus facilement que l'ATP exogène (Bessmann et al., 1980). Le système compétitif phosphoénolpyruvate/pyruvate kinase (PEP/PK) pour l'ADP produit par les CK montre aussi un fort couplage entre les CK et les ATPases (Saks et al., 1984). Dans ces expériences, des enzymes solubles ont été comparées aux myofibrilles. La production de Cr et de pyruvate dans le système d'enzymes solubles dépend directement des activités des 2 enzymes (ATPases et CK). Dans les préparations de myofibrilles, même le rapport PK/CK de 100 n'est pas suffisant pour inhiber la production de Cr (Saks et al., 1984), montrant l'accès de l'ADP vers la réaction de la CK du à l'immobilisation des 2 enzymes. La nature du couplage a été soigneusement étudiée morphologiquement (Wegmann et al., 1992) et malgré une distance CK-ATPase supérieure à 10 nm, c'est-à-dire dans la situation où le couplage fonctionnel entre les enzymes serait perdu (Fossel et Hoefler., 1987), les données cinétiques prouvent l'existence d'un fort couplage (Krause et Jacobus., 1992). Donc la colocalisation d'enzymes dont les réactions qu'elles catalysent sont consécutives, pourrait augmenter l'efficacité de leur couplage cinétique. Cette proximité est en faveur d'une canalisation des métabolites. Une telle canalisation a été observée dans des cellules de cœur de grenouille traitées au Triton-X 100 : l'ATP était directement canalisé de la CK vers le site de la myosine ATPase et ne diffusait pas dans la solution (Arrio-Dupont, 1988).

De même, MM-CK est fortement liée aux membranes du RS, où elle est fonctionnellement couplée à la SERCA, pour assurer un approvisionnement énergétique efficace du RS par la régénération locale d'ATP (Levitskii et al., 1977; Rossi et al., 1990 ; Korge et al., 1993 ;1994 ; Minajeva et al., 1996). L'ATP régénéré par les CK endogènes n'est pas en équilibre avec l'ATP du milieu environnant mais il est préférentiellement utilisé par la CaATPase du RS pour le captage du Ca^{2+} (Korge et al., 1993). La translocation efficace de l'ATP de la CK vers la SERCA, malgré la présence d'un piège externe pour l'ATP du milieu environnant, peut être expliqué par la proche localisation de la CK et de la CaATPase sur la membrane du RS. Plusieurs facteurs (quantité de CK liée à la membrane, oxydation des groupements thiols (-SH) de la CK, diminution de la [PCr]) peuvent influencer la capacité du système PCr/Cr à supporter un faible rapport ATP/ADP et alimenter les pompes calciques en ATP (Korge et al., 1993).

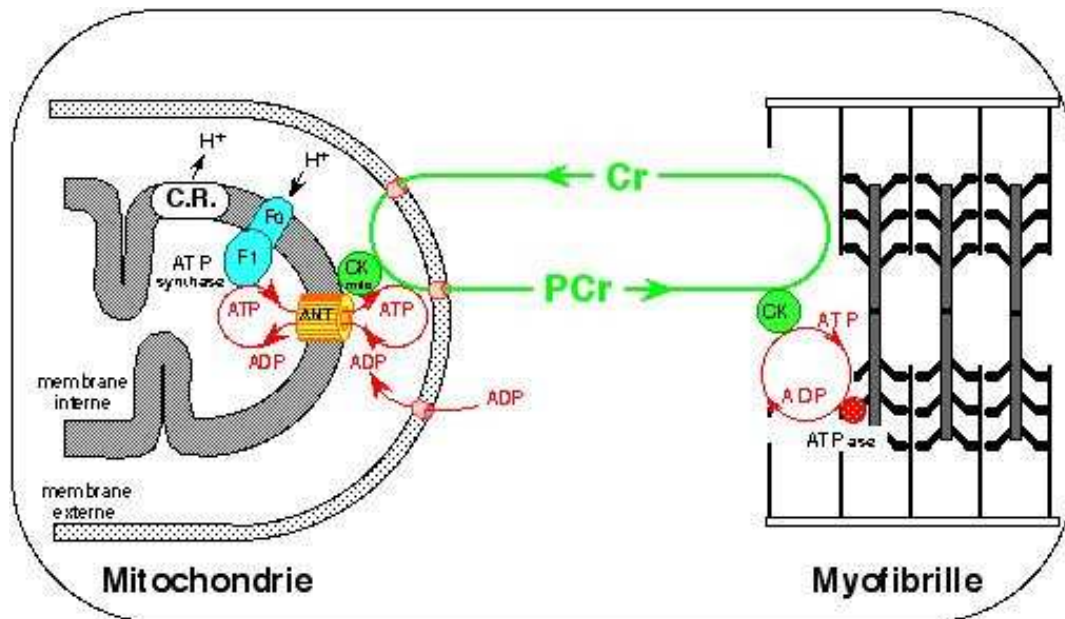
Dans le cytoplasme, la réaction de la MM-CK est couplée au système glycolytique qui assure l'utilisation de l'ATP produit par la phosphoglycérate kinase et la PK. L'interaction entre les systèmes glycolytiques et la phosphorylation oxydative peut être efficacement régulée par le système de la CK : un rapport PCr/Cr (du à la respiration mitochondriale élevée) dans le cytoplasme inhibe l'ensemble des flux glycolytiques à cause d'une disponibilité limitée de l'ADP (Kupriyanov et al., 1980).

A.3.3. Conséquences métaboliques du couplage fonctionnel des créatine kinases

Le système des CK et de la navette PCr/Cr reliés au système ATP-ADP a deux fonctions clairement définies (Fig. 18) :

1. dans le temps, tamponner l'énergie pour maintenir un rapport ATP/ADP adéquat dans les cellules quand la demande énergétique augmente (McGilvery et Murray., 1974; Connett, 1988) et
2. dans l'espace, tamponner l'énergie pour maintenir des rapports ATP/ADP locaux constants ou servir au transport de l'énergie (Saks et al., 1994; 1998a; 2004; Wallimann et Hemmer., 1994 ; Ventura-Clapier et al., 1994).

Fig 18. Schéma du transfert de l'énergie dans la cellule par la navette PCr/Cr grâce aux CK. Le transport des composés phosphate riches en énergie est réalisé par une chaîne de molécules de CK transportant l'ATP du site de production (mitochondrie) vers le site de consommation d'énergie (myosine ATPases, canaux ioniques de transport) envoyant un signal de retour à la mitochondrie. Le transport est effectué au-dessus de pools locaux d'ATP, ADP, PCr et Cr sans changement des concentrations totales des nucléotides adényliques. (D'après Saks et al., 2000)



Un aspect pratique de cette fonction temporelle de tampon nous permet de calculer la concentration libre d'ADP cytoplasmique dans les cellules (aux environs de $50 \mu\text{M}$), ce qui ne peut pas être mesuré biochimiquement ou par RMN, cet aspect est très largement exploité en pratique dans les études modernes (Saks et al., 1996). Ce concept donne des explications satisfaisantes de certains événements (concentrations, flux, etc, ...) mais n'est pas suffisant pour expliquer l'existence de différentes isoenzymes de CK (qui possèdent des caractéristiques cinétiques et thermodynamiques très similaires et une structure conservée de leur site actif) (Muhlebach et al., 1994), ainsi que l'apparition dans l'évolution de la MiCK.

La fonction spatiale de tampon du transport énergétique est la navette PCr/Cr entre les sites de production d'ATP et les sites utilisateurs. Pour ce faire, la PCr joue le rôle de transporteur d'énergie en connectant les sites mitochondriaux de la phosphorylation oxydative aux sites utilisateurs de l'énergie (Ventura-Clapier, 2004 ; Saks et al., 2004). Joubert a montré expérimentalement le rôle de la CK à la fois comme tampon et comme navette à travers les isoformes des CK dans le cœur isolé et le myocarde. Il a mis en évidence la versatilité physiologique des voies de transfert énergétiques par l'ATP et la PCr (Joubert et al., 2004).

Différentes données supportent la fonction des CK :

- (i) la compartimentation spécifique subcellulaire des différentes isoenzymes (Wallimann et al., 1992)
- (ii) la compartimentation subcellulaire ATP/ADP et du Pi (Saks et al., 1984; 1991; Savabi, 1994; Gellerich et al., 1987; Zeleznikar et Goldberg., 1991)

- (iii) la localisation, la structure et les propriétés fonctionnelles de l'octamère de MiCK (Wyss et Wallimann., 1992 ; Wallimann et al., 1992 ; Wyss et al., 1992)
- (iv) le marquage *in vivo* à l'¹⁸O des résidus phosphoryl des métabolites dans le diaphragme intact montrant qu'un discret « pool » de nucléotides adényliques existe dans les cellules et que la vitesse d'apparition de [¹⁸O]PCr coïncident avec la vitesse d'échange des groupements phosphates catalysé par la CK fonctionnant obligatoirement comme une navette PCr (Zelevnikar et Goldberg., 1991)
- (v) le phénomène de couplage fonctionnel est décrit dans la section précédente.

L'analyse de l'équation d'équilibre a montré en fait qu'environ 99% du flux d'énergie via l'équilibre de la CK est représenté par la PCr par un mécanisme de diffusion facilitée (Meyer et al., 1984). Ceci modifie également le concept de rôle tampon de la CK comme étant un système doté d'une capacité métabolique avec une fonction tampon spatiale (maintien des rapports ATP/ADP locaux constants) (Meyer et al., 1984 ; Meyer, 1988 ; Sweeney, 1994). Ceci prend en considération l'organisation structurale des cellules, notamment que l'espace cytoplasmique contient une quantité significative de MM-CK entre les mitochondries et les myofibrilles. La diffusion facilitée est définie comme un procédé de transport passif ; par lequel les molécules diffusent à travers les membranes grâce à des transporteurs (protéines). La combinaison de la diffusion facilitée des composés phosphate riches en énergie dans le cytoplasme avec la fonction de stockage d'énergie confère au système de la CK la propriété de capacité métabolique (Meyer, 1998 ; Sweeney, 1994).

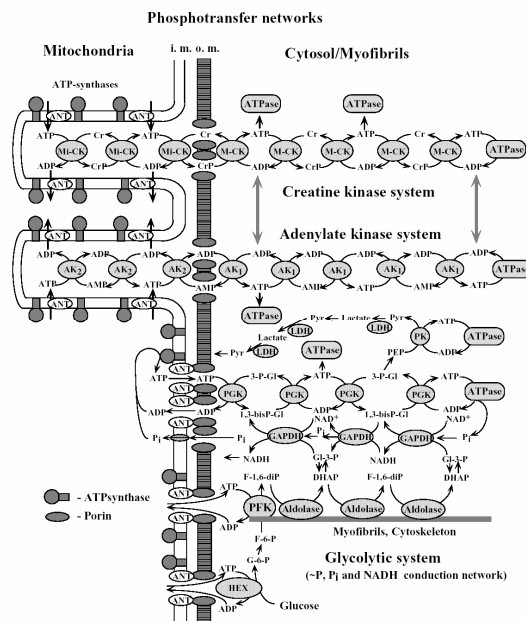
Les souris déficientes en isoformes cytosoliques et/ou mitochondriales de la CK montrent un remodelage au niveau fonctionnel, métabolique et structural des muscles squelettiques rapides. La performance à l'exercice des souris double knock-out est 10 fois moindre que celle des contrôles, celle des knock-out pour MM-CK étant intermédiaire. Ceci s'accompagne d'une perte de masse musculaire importante (Monken et al., 2005).

Crozatier a montré le rôle spécifique de la CK dans le couplage excitation –contraction du muscle cardiaque qui ne peut pas être compensé par d'autres voies (Crozatier, 2002).

Tandis que les CK sont essentiellement importantes, d'autres systèmes peuvent également être impliqués comme les systèmes d'enzymes glycolytiques et l'adénylate kinase (AK) (Ventura-Clapier et al., 2004). Une redistribution du transfert des liaisons phosphates riches en énergie à travers les réseaux glycolytiques et de l'AK (Adénylate Kinase) contribue à l'homéostasie énergétique des muscles sous des stress génétiques et métaboliques compensant la perte de la fonction des CK (Dzeja et al., 2004).

En effet, l'étude de Janssen (Janssen et al., 2003) suggère un réseau coordonné de voies métaboliques complémentaires qui sert à maintenir l'homéostasie énergétique et l'efficacité physiologique. Les muscles squelettiques possédant une mutation soit du gène AK1 (isoforme 1 de l'adénylate kinase) soit de MCK montrent des anomalies énergétiques couplées à des réarrangements métaboliques et des adaptations des systèmes de phosphotransferts cellulaires. L'absence de AK1 entraîne une augmentation du flux à travers les phosphotransferts cellulaires catalysés par la CK tandis que l'absence de MCK conduit à une élévation de l'activité des phosphotransferts catalysés par l'AK.

Fig. 19 Les réseaux de transfert d'énergie dans les cellules musculaires. (D'après Dzeja et al., 2004).



A.4. Régulation de la respiration *in situ*

De nombreuses informations concernant la régulation de la respiration cellulaire provient de l'étude des mitochondries isolées. La principale conclusion tirée de ces expériences est que le besoin en ATP par les cellules n'est pas constant et que par conséquent il existe un contrôle strict de la production d'ATP selon la demande énergétique des systèmes consommant l'énergie dans les cellules. Une des principales caractéristiques mitochondriales est la dépendance de la consommation d'oxygène vis-à-vis de la concentration en ADP libre.

Lardy et Wellmann ont expérimentalement démontré l'existence d'un contrôle respiratoire et l'effet découplant du dinitrophénol sur la respiration de mitochondries isolées

(Lardy et Wellmann., 1952). Quelques années plus tard, Chance et Williams ont proposé une théorie très largement répandue sur la régulation de la phosphorylation oxydative par un contrôle négatif impliquant l'ADP (Chance et Williams., 1956). Cette méthode utilisant la spectrophotométrie à 2 longueurs d'onde combinée à une électrode à oxygène, a permis de déterminer les états de différents transporteurs d'électrons selon les états métaboliques.

Chance et Williams, par convenance, ont compté les différents états possibles des mitochondries :

Stade 1 : Mitochondries seules dans le milieu sans ADP ni substrats respiratoires

Stade 2 : Addition des substrats, respiration faible due à un manque d'ADP

Stade 3 : Addition d'une quantité limitée d'ADP permettant une respiration rapide

Stade 4 : Tout l'ADP est converti en ATP, la respiration diminue

Stade 5 : Anoxie

Les mitochondries *in vitro* ont une très haute affinité pour l'ADP. Pour ces mitochondries *in vitro*, le K_m est de l'ordre de 10-20 μM (Lardy et Wellmann., 1952 ; Chance, 1952). Gellerich et ses collègues (Gellerich et al., 1998 ; 2002) ont proposé que les macromolécules peuvent restaurer les changements morphologiques dus à l'isolement des mitochondries alors que les études antérieures étaient effectuées sur des mitochondries isolées en suspension dans un milieu isotonique sans macromolécules dans lequel l'espace intermembranaire est large. Il a été montré qu'en présence de dextran, la perméabilité de la membrane externe mitochondriale pour les nucléotides adényliques diminue, ce qui a de fortes conséquences sur le transport de l'ADP dans la mitochondrie. En supposant que 15% de dextran mime la pression oncotique intracellulaire sur les mitochondries *in vivo*, le K_m apparent de la phosphorylation oxydative pour l'ADP à l'intérieur de cellules intactes est autour de 50 μM ce qui est, quelque peu plus élevé que la concentration d'ADP libre reporté dans le cœur intact (Gellerich et al., 1998 ; 2002).

La méthode d'étude des mitochondries isolées permet de parfaitement contrôler la composition du milieu extérieur des organelles. De plus, elle est fiable, rapide et relativement bon marché. Cependant, l'isolement des mitochondries par homogénéisation du tissu et sédimentation des mitochondries par centrifugation peut sérieusement affecter les propriétés fonctionnelles de ces organelles. La dégradation de l'architecture intracellulaire peut altérer les interactions des mitochondries avec l'espace extramitochondrial et détruire la structure organisée du cytoplasme. Ceci est particulièrement important si les mitochondries sont isolées à partir d'un tissu ayant déjà subi des dommages par un processus pathologique. En outre, la

production limitée de mitochondries (10-20%) obtenue à partir de la procédure d'isolement ne permet pas l'étude de toutes les populations de mitochondries du tissu.

A.4.1. Régulation de la respiration par l'ADP : fibres perméabilisées

Le concept de régulation de la respiration par l'ADP ne peut pas expliquer l'observation faite dans les cellules cardiaques que la vitesse de respiration augmente parallèlement à la charge de travail sans augmentation de l'ADP. Cette contradiction souligne que la régulation de la respiration doit être différente dans les mitochondries isolées et les cellules intactes. A cet égard, de nouvelles informations quantitatives ont été obtenues à partir des études sur les fibres perméabilisées.

L'idée d'utiliser un détergent pour la perméabilisation du sarcolemme et l'étude des organelles intracellulaires est venue d'un travail d'Endo et Kitazawa (Endo et Kitazawa., 1978). L'utilisation spécifique de détergents (saponine, digitonine) pour perméabiliser les membranes (Bangham et al., 1962) permet l'étude de la fonction des organelles tout en maintenant l'architecture et en contrôlant le milieu intracellulaire (Veksler et al., 1987 ; Saks et al., 1991; 1993; 1994; 1995a; Kaasik et al., 2001). La saponine et la digitonine, à cause d'un cœur stéroïde hydrophobe, ont une haute affinité pour le cholestérol et préférentiellement le cholestérol extrait des membranes. Ils s'attaquent donc spécifiquement aux membranes riches en cholestérol comme le plasmalemm (Korn, 1969). Le réticulum endoplasmique a un plus faible contenu en cholestérol ; la membrane interne mitochondriale a encore moins de ce lipide (Comte et al., 1976 ; Saks et al., 1985). Cette méthode peut être appliquée sur de très petits échantillons de tissus, rendant ainsi possible l'étude de la fonction mitochondriale de biopsies humaines, tissus d'animaux transgéniques, cultures cellulaires (Saks et al., 1998b).

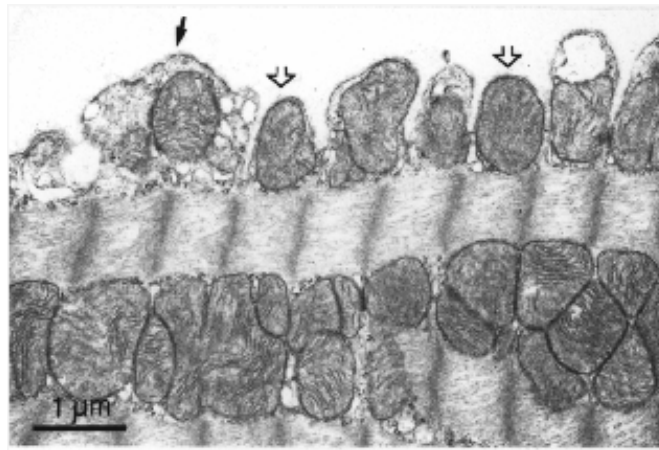
La méthode d'investigation de la fonction mitochondriale dans les préparations perméabilisées a été validée selon les critères suivants :

1. une morphologie des mitochondries préservée
2. une perméabilisation complète du sarcolemme
3. des fonctions mitochondriales normales

Des études ultrastructurales des préparations perméabilisées par plusieurs groupes (Saks et al., 1993, 1991; Penman, 1995 ; Lin et al., 1990 ; Kunz, 1993a) ont montré que des cardiomyocytes traités à la digitonine gardent une bonne morphologie globale (Altschuld et al., 1985), que les mitochondries restent intactes et gardent une apparence identique à celles des cellules non traitées. Les sarcomères des cellules traitées à la digitonine restent bien alignés avec un léger épaissement des disques Z.

Des études de microscopie électronique de fibres perméabilisées de ventricules (Veksler et al., 1987 ; Saks et al., 1993) ont également révélé une ultrastructure intact des mitochondries et du RS alors que le sarcolemme était complètement dissout (Fig 20).

Fig. 20. Microscopie électronique de fibres cardiaques perméabilisées à la saponine. (D'après Saks et al., 1995b)



Le groupe de Penman a utilisé un traitement de 100 µg/ml de saponine pendant 30 min pour perméabiliser les cellules des muscles lisses montrant que dans ces conditions non seulement la membrane externe mitochondriale mais aussi ses nombreux points de contact avec le cytosquelette étaient parfaitement conservés (Penman et al., 1995 ; Lin et al., 1990).

Les mitochondries des fibres perméabilisées à la saponine sont capables d'utiliser différents substrats ce qui suggère que tous les complexes de la chaîne respiratoire sont actifs (Kunz et al., 1993 a, b). L'ADP stimule la respiration des préparations perméabilisées de telle sorte que l'ACR soit de 5-7 pour le muscle cardiaque de plusieurs espèces. Une mesure directe de la synthèse d'ATP dans les cellules perméabilisées à la digitonine a montré que les rapports ATP/O étaient très similaires à ceux obtenus sur mitochondries isolées en utilisant les mêmes substrats (Ouhabi et al., 1994).

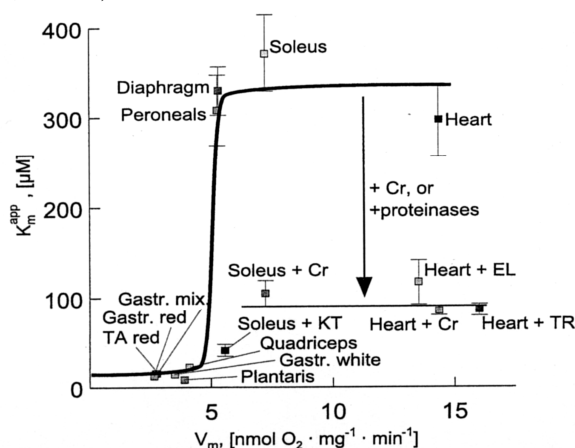
A.4.2 Cinétique de la régulation de la respiration par l'ADP *in situ*

L'explication conventionnelle de la vitesse de respiration des mitochondries dans les cellules gouvernée par la concentration d'ADP cytosolique selon la relation de Michaelis-Menten est en désaccord avec de nombreuses données expérimentales (Saks et al., 1994, 1995 ; Balaban, 1990 ; Wan et al., 1993 ; Jeffrey et Malloy., 1992). Dans les fibres perméabilisées au sein desquelles les mitochondries sont localisées dans des structures cellulaires intactes, l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP dans les tissus oxydatifs comme

le cœur, le soléaire (mais également dans les hépatocytes perméabilisés, les homogénats de cerveau et le diaphragme) est étonnamment diminuée, excédant celle des mitochondries *in vitro* de plus d'un ordre de magnitude (Bygrave et Lehninger., 1967 ; Wiseman et al., 1996 ; Ouhabi et al., 1994 ; Saks et al., 1989, 1994, 1995a). L'ADP exogène est caractérisé par un très haut K_m apparent égal à 300-400 μM (Saks et al., 1989, 1991, 1993, 1995a, 1998b, Kay et al., 1997). Veksler a trouvé que dans les fibres perméabilisées de muscle rapide, l'affinité des mitochondries pour l'ADP est élevée et du même ordre que celui des mitochondries isolées (Veksler et al., 1995). Ces observations ont clairement montré que la régulation de la fonction mitochondriale est différente dans ces deux types de muscles (c'est-à-dire qu'elle est tissu-spécifique) (Cf Fig. 21 et Saks et al., 1998b).

Fig. 21. Tissu-spécificité de l'affinité du système respiratoire mitochondrial pour l'ADP.

Les affinités sont faibles (K_m apparent pour l'ADP élevé) dans le cœur, le soléaire, le diaphragme, le péroné et augmentent après un traitement à la trypsine (TR), à l'élastase (EL), chymotrypsine (KT) ou en présence de créatine (Cr). Dans tous les types de fibres de muscle squelettiques rapides, l'affinité mitochondriale pour l'ADP est très élevée (K_m apparent très bas) et n'est pas sensible à la trypsine ou à la Cr. (D'après Saks et al., 1998b).



Ces observations montrent aussi que la valeur élevée du K_m ne peut pas être trivialement expliquée par la diffusion limitée de l'ADP dans la cellule comme cela a été suggéré dans quelques études (Seppet et al., 2004). Tous les résultats théoriques et expérimentaux nous donnent des arguments solides et clairs contre cette simple explication (Aliev et Saks., 1997 ; Saks et al., 1991, 1993, Vendelin et al., 2000 ; Weiss et Korge, 2001 ; Fontaine et al., 1995). Dans les fibres perméabilisées de soléaire, l'inhibition partielle de la respiration par l'azide de sodium (NaN_3) ne diminue pas significativement le K_m apparent pour l'ADP, excluant une possible explication d'une faible affinité apparente des mitochondries pour l'ADP dans ces cellules et sa consommation rapide due à une forte activité oxydative et des problèmes de diffusion intracellulaires (Kay et al., 1997). L'affinité des mitochondries dans les fibres perméabilisées peut être augmentée de 3 façons :

- (i). par le gonflement des mitochondries et la rupture de la membrane externe mitochondriale par traitement hyposmotique
- (ii). par traitement protéolytique des fibres perméabilisées
- (iii). par isolement des mitochondries

Dans les muscles lents, l'activation de la réaction couplée de la CK par l'addition de Cr, initiant la régénération d'ADP dans l'espace intermembranaire, diminue de manière significative le Km pour l'ADP exogène jusqu'à 70-100 μM (Table 1).

Les résultats indiquent un couplage fonctionnel étroit entre la MiCK et l'ANT dans les fibres de soléaire et de cœur (Veksler et al., 1987 ; Saks et al., 1993, 1994). Pour les fibres de gastrocnémien, l'effet n'a pas été observé par les méthodes standard (oxygraphie). L'effet de la créatine était partiellement absent dans les cœurs de grenouille (Kuznetsov et al., 1996).

Dans le cœur ischémique, le changement le plus précoce est le gonflement mitochondrial pouvant résulter en la rupture de la membrane externe mitochondriale ou la dissociation de la CK de la membrane interne mitochondriale. C'est la raison pour laquelle, la respiration stimulée par la créatine dans les fibres perméabilisées est un indicateur très sensible de l'étendue d'un dommage ischémique aigu ainsi qu'à l'inverse l'efficacité d'une protection cardioplégique du cœur et sa préservation (Rossi et al., 1998).

Un traitement hyposmotique a pour conséquence la rupture de la membrane externe mitochondriale et la perte de l'effet du cytochrome c exogène et la valeur du Km apparent pour l'ADP, à la fois sur fibres cardiaques et hépatocytes perméabilisés, diminue en corrélation avec l'étendue de l'endommagement de la membrane externe. Dans les cellules du cœur et du foie, il en a été conclu que la diffusion de l'ADP était retardée à cause d'une très faible perméabilité de la membrane externe mitochondriale pour l'ADP (Saks et al., 1995a, 1996). La conclusion selon laquelle les VDAC de la membrane externe mitochondriale limitent la perméabilité pour l'ADP dans les cellules *in vivo* a été établie à partir des résultats du gonflement hyposmotique aboutissant à la rupture de la membrane externe et une diminution du Km apparent pour l'ADP (Saks et al., 1993, 1994, 1995a).

Table 1. Vitesses maximales de respiration et Km apparent pour l'ADP de différentes fibres musculaires. (Modifié d'après Kuznetsov et al., 1996). Km app : Km apparent, n.d : non déterminé, GB : gastrocnémien blanc ; GR : gastrocnémien rouge. Résultats donnés en moyennes \pm écart type. Trypsine, chymotrypsine et élastase ont été utilisées à des concentrations de 125 $\mu\text{g/ml}$.

Tissu	Traitement	Km app (ADP), μM	Vmax, nmol O ₂ /min/mg dw
<i>Cœur de rat</i>	Aucun	297 \pm 35	28.7 \pm 11

	20 mM créatine	85 ± 5	28.0 ± 4
	Fibres fantômes	351 ± 32	46.7 ± 1.5
	Trypsine	98 ± 8	26.0 ± 1
	Chymotrypsine	143 ± 25	33.5 ± 2.0
	Elastase	117 ± 24	27.0 ± 1.5
<i>Soléaire de rat</i>	Aucun	354 ± 46	12.2 ± 0.5
	20 mM créatine	105 ± 15	16.0 ± 4
	Fibres fantômes	320 ± 22	17.0 ± 0.4
	Trypsine	59 ± 6.0	n.d
	Chymotrypsine	41 ± 8	11.8 ± 2
	Elastase	42 ± 10	9.3 ± 1.0
<i>GB de rat</i>	Aucun	14.4 ± 2.6	7.0 ± 0.5
	20 mM créatine	13 ± 10	5.4 ± 2.4
	Trypsine	25 ± 4	8.9 ± 0.5
<i>GR de rat</i>	Aucun	12.5 ± 2.7	5.3 ± 0.3
	20 mM créatine	15 ± 8.5	7.6 ± 2.8
	Trypsine	10 ± 2.8	n.d
<i>Quadriceps de rat</i>	Aucun	22.3 ± 1.4	8.2 ± 1.2
	20 mM créatine	3.5 ± 0.7	6.2 ± 0.5
<i>Plantaire de rat</i>	Aucun	8.3 ± 5.4	7.8 ± 4.5
	20 mM créatine	20 ± 10	8.7 ± 2.3
<i>Cœur de grenouille</i>	Aucun	94 ± 18	n.d

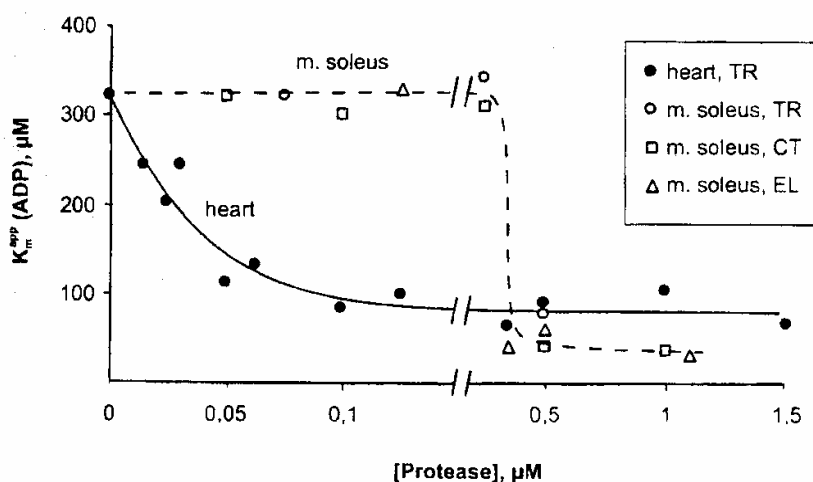
A.4.3 Traitement protéolytique et contrôle respiratoire

Une protéolyse limitée augmente l'affinité des mitochondries de cœur et des muscles lents pour l'ADP sans détruire la membrane externe mitochondriale. Un traitement des fibres à la trypsine, chymotrypsine ou l'élastase diminue le K_m apparent pour l'ADP (Figs. 21 et 22) dans le cœur et le soléaire jusqu'à 40-98 μM sans altération décelable de la membrane externe mitochondriale (Kuznetsov et al., 1996, Table 1). Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle la sensibilité mitochondriale pour l'ADP *in vivo* est contrôlée par des protéines cytoplasmiques. Les cardiomyocytes fantômes (dont la myosine a été extraite), qui contiennent en majorité mitochondries, RS et cytosquelette ont une forme normale et un K_m apparent pour l'ADP élevé (Kay et al., 1997). Dans les homogénats de foie, le traitement à la trypsine diminue

également la valeur du K_m pour l'ADP. Ces résultats montrent que la diffusion de l'ADP dans les hépatocytes pourrait être retardée par des facteurs protéiques sensibles à la trypsine qui seraient perdus lors de l'isolement des mitochondries (Fontaine et al., 1995).

Les procédés de congélation lente permettent l'observation de nombreuses connections entre les mitochondries et la surface myofibrillaire dans le tissu myocardique de rat (Rappaport, 1998). Ces résultats vont dans le sens d'un K_m apparent élevé dans la régulation de la phosphorylation oxydative du cœur et des muscles lents *in vivo* expliqué par une faible perméabilité des VDAC de la membrane externe mitochondriale mais aussi par des problèmes de diffusion de l'ADP dans la cellule. Une fois de plus, il est suggéré que des protéines associées au cytosquelette contrôlent la perméabilité de VDAC pour l'ADP.

Fig. 22. Effet du traitement à la trypsine des fibres de cœur et de soléaire de rat. TR : Trypsine ; CT : Chymotrypsine, EL : Elastase. (D'après Saks et al., 1998b)



Tous les résultats expérimentaux et théoriques recueillis nous donnent jusqu'ici 5 arguments clairs et forts pour cette explication :

(1). L'analyse de la diffusion de l'ADP entre la phase aqueuse (cytosol) et le milieu extracellulaire, en prenant D la constante de diffusion de l'ADP dans l'eau, a prouvé que la vitesse de cet échange dans l'eau est beaucoup plus rapide que le 'turnover' ADP-ATP à l'intérieur des fibres. Ceci est conforme à beaucoup de calculs précédents utilisant 'équation d'Einstein-Smoluchovski pour le mouvement brownien tridimensionnel avec la distance de diffusion, dl , qui correspond au déplacement des molécules d'ADP pendant la période τ du 'turnover' de l'ADP dans les mitochondries, on a (West, 1997) :

$$dl^2 = 6D\tau$$

On peut trouver que cette distance dl est de $14 \mu\text{m}$ pour $\tau = 100 \text{ ms}$, ce qui excède clairement la taille du sarcomère et même celle du rayon des cardiomyocytes. Ainsi il n'y a probablement pratiquement aucun gradient d'ADP entre les phases aqueuses à l'intérieur et en dehors des cellules.

(2). Le K_m apparent pour l'ADP exogène ne dépend pas de l'activité de la MgATPase. Il ne change pas avec ou sans Ca^{2+} et Mg^{2+} , malgré le fait que, sans Mg^{2+} , l'activité de l'ATPase est très basse, tandis que le Ca^{2+} augmente l'activité de la MgATPase (les activités diffèrent d'au moins 5 fois dans ces conditions) (Saks et al., 2001).

(3). Dans les muscles rapides (glycolytiques) le diamètre des myocytes est 3 à 5 fois plus grand que celui trouvé dans les muscles rouges. Ainsi, on pourrait s'attendre à un K_m apparent pour l'ADP exogène significativement accru dans les muscles blancs. Les expériences, cependant, montrent le contraire; dans les muscles glycolytiques le K_m apparent pour l'ADP exogène est très bas ($7\text{-}10 \mu\text{M}$) et peu différent de celui pour les mitochondries *in vitro* (Kay et al., 1997; Kuznetsov et al., 1996). Quand la respiration des fibres rouges a été partiellement inhibée, le K_m apparent observé pour l'ADP exogène dans les fibres rouges excédait toujours largement celui des fibres blanches, en dépit du diamètre plus petit des fibres rouges (Kay et al., 1997).

(4). Initialement, on a proposé que le K_m apparent élevé pour l'ADP exogène pourrait être le résultat des problèmes de diffusion pour l'ADP dans les myofibrilles (Saks et al., 1991). Néanmoins, l'extraction de la myosine par le KCl (800 mM) n'a eu aucun effet sur la valeur du K_m apparent pour l'ADP exogène (Saks et al., 1993). En même temps, on a découvert que la rupture de la membrane mitochondriale externe par le traitement hyposmotique des fibres perméabilisées entraînait des diminutions du K_m apparent pour l'ADP exogène vers des valeurs très basses, proches de celles observées pour les mitochondries isolées *in vitro* (Saks et al., 1993). On a également constaté que la présence de Cr (due à la membrane mitochondriale externe), dans l'espace intermembranaire des mitochondries, participant à la réaction couplée mitochondrie-MiCK, diminue le K_m apparent pour l'ADP exogène (Saks et al., 1991; 1993).

(5). Une diminution significative du K_m apparent pour l'ADP exogène dans la régulation de la respiration mitochondriale *in vivo* est obtenue par un traitement protéolytique plutôt sélectif des fibres perméabilisées de muscle et des hépatocytes sans aucun changement évident de la géométrie des cellules ou des activités enzymatiques, telles que la MgATPase (Kuznetsov et al., 1996).

A.5. ICEUs et communication intracellulaire

A.5.1. Notion d'unités énergétiques intracellulaires : ICEUs

Les cardiomyocytes montrent, en microscopie à fluorescence, une organisation structurale bien établie alors qu'après un traitement protéolytique une désorganisation structurale de ces cellules est observée. Un marquage des mitochondries au nonylacridine orange (NAO), marqueur spécifique des cardiolipines de la membrane interne, ne pénétrant pas en fonction du potentiel membranaire mitochondrial à la différence de la rhodamine (ou par une autre sonde fluorescente) révèle une distribution ponctuée des mitochondries le long des disques Z en stries parallèles, entre les myofibrilles (Kay et al., 1997 ; Saks et al., 2001 ; Vendelin et al., 2005).

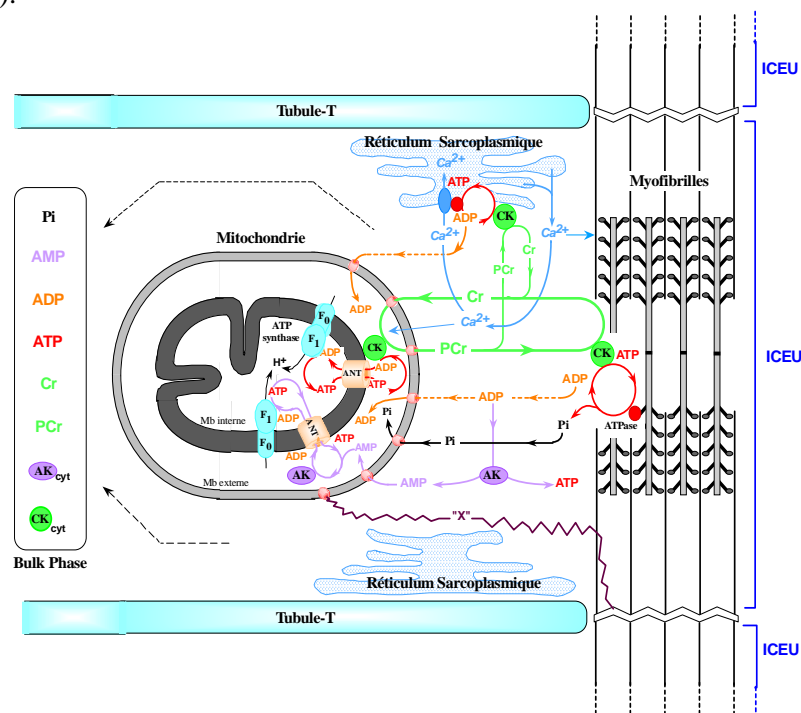
Il existerait non seulement une organisation structurale mais aussi une organisation fonctionnelle : les ICEUs (IntraCellular Energetic Units) (Seppet et al., 2001 ; Saks et al., 2001). Les cellules cardiaques s'organiseraient en ICEUs, ou unités énergétiques intracellulaires. Les organites de proximité : les mitochondries, le réticulum sarcoplasmique (RS) et les myofibrilles sont associés en une architecture de proximité grâce au cytosquelette (Appaix et al., 2003 ; Andrienko et al., 2003). Ces ICEUs seraient caractérisées par des liens fonctionnels entre mitochondries, myofibrilles et réticulum sarcoplasmique qui permettraient de coupler la production locale d'ADP à son utilisation pour la synthèse d'ATP dans la matrice. Ainsi, les CK cytoplasmiques et mitochondriales couplées aux différentes ATPases cellulaires permettent la production et le transport d'énergie dans chaque unité intracellulaire, puisque ces systèmes enzymatiques sont présents dans chacune des ICEUs. Dans ces unités indépendantes les unes des autres, il existerait un phénomène d'hétérogénéité du niveau d'énergisation des mitochondries dans certaines conditions métaboliques (déplétion en substrat) comme l'ont décrit Romashko et ses collègues (Romashko et al., 1998). Plus récemment, ce même groupe a observé des oscillations coordonnées de l'état énergétique des mitochondries des cellules cardiaques ($\Delta\Psi_m$, NADH et production d'espèces réactives de l'oxygène, ROS) pouvant être induites par quelques éléments du réseau mitochondrial indiquant que les mitochondries représentent un système complexe 'auto organisé' suite à un stress oxydant (Aon et al., 2003). L'accumulation de ROS mitochondriaux jusqu'à un seuil critique est un déterminant clé de la propagation et de la synchronisation de la réponse à travers la réseau mitochondrial. Ces auteurs ont proposé qu'une propagation au sein de la cellule d'une perturbation locale était médiée par la libération de ROS de la mitochondrie conduisant à un mécanisme de 'ROS-induced ROS release' (terme inventé par Zorov, Zorov

et al., 2000). Les mitochondries seraient organisées en une matrice de percolation avec les ROS comme messagers clés. La théorie de percolation décrit comment les interactions voisin-voisin déterminent les propriétés macroscopiques spatiotemporelles d'une matrice excitable (Aon et al., 2004).

Il existerait donc un facteur capable de synchroniser les unités entre elles au sein d'un même cardiomyocyte. De même, toutes les molécules de la phase cytosolique (bulk phase) servent de réserve à la vie de la cellule.

Les ICEUs sont organisées par les interactions entre les mitochondries, le réticulum sarcoplasmique et les sarcomères avec le cytosquelette (Fig. 23).

Fig 23. Schéma des Unités Energétiques Intracellulaires dans les cellules cardiaques. Les mitochondries, le RS et les Mg-ATPases des myofibrilles sont connectés par la canalisation métabolique des intermédiaires de réaction au sein des ICEUs par les systèmes de myokinase (ou adénylate kinase) et créatine kinases. Les facteurs protéiques (non identifiés à ce jour et marqués 'X'), certainement connectés au cytosquelette, fixent la position des mitochondries et contrôlent sans doute aussi la perméabilité de VDAC pour l'ADP et l'ATP. Ceci augmente la microcompartimentation des nucléotides adényliques dans les ICEUs. Par interaction avec les éléments du cytosquelette, les mitochondries et le RS sont précisément fixés entre 2 disques Z et 2 tubules T. Les nucléotides adényliques des ICEUs ne s'équilibrent pas rapidement avec ceux de la phase cytosolique et pourraient être connectés par des métabolites qui diffusent plus vite comme la créatine ou la phosphocréatine. L'ATP de la phase cytosolique pourrait constituer une réserve métabolique cellulaire ou servir à des fins de régulation. Abréviations: AK, adénylate kinase; AK_{cyt}, adénylate kinase cytosolique AMP : Adénosine MonoPhosphate, CK créatine kinase; CK_{cyt}, créatine kinase cytosolique, Cr, créatine, FoF1, ATPase-synthase mitochondriale, PCr, phosphocréatine, Pi, phosphate inorganique, 'X', facteur protéique encore inconnu contrôlant la fonction mitochondriale. (D'après Saks et al., 2001).

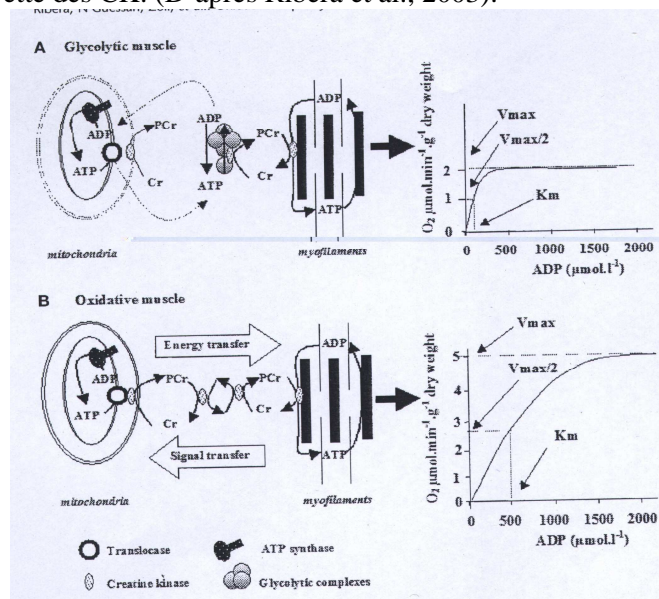


A.5.2. Canalisation métabolique de l'ADP exogène et compartimentation intracellulaire

Ces complexes jouent un rôle important dans la canalisation métabolique de l'ADP endogène par un couplage effectif entre la production locale d'ADP (par les systèmes compétents qui consomment de l'ATP) et son utilisation pour la synthèse d'ATP dans la matrice mitochondriale. Ces mécanismes de canalisation sont reliés à l'augmentation de l'hétérogénéité de la diffusion intracellulaire de l'ADP et de l'ATP ainsi qu'à leurs restrictions locales de diffusion dues à l'organisation spécifique des ICEUs.

Donc, selon cette hypothèse, l'augmentation de la valeur du K_m pour l'ADP exogène dans la régulation de la respiration mitochondriale dans les fibres perméabilisées montre un meilleur degré d'organisation structurale. Dans les muscles lents, l'énergie est transférée entre les mitochondries et les myofibrilles par la navette Cr/PCr tandis que dans les muscles rapides l'énergie pour la contraction est fournie en grande partie par les systèmes glycolytiques via un équilibre entre les CK cytosoliques et les systèmes couplés myofibrillaires MM-CK (Fig. 24).

Fig. 24. Représentation schématique des différences entre les muscles oxydatifs et glycolytique. Organisation schématique intracellulaire de la production mitochondriale d'énergie et les transferts énergétiques pour le muscle glycolytique (A) et le muscle oxydatif (B). (A) Le muscle glycolytique est caractérisé par (1) une faible capacité oxydative maximale, représentée par une faible respiration maximale (V_{max}) et une production d'ATP glycolytique; (2) une sensibilité élevée de la respiration mitochondriale pour l'ADP (faible K_m), le signal pour la respiration est l'ADP cytosolique; (3) des transferts d'énergie non couplés dans la cellule entre les mitochondries et les ATPases. (B) Le muscle oxydatif est caractérisé par (1) une capacité oxydative maximale élevée, représentée par une respiration stimulée par l'ADP élevée; (2) une faible sensibilité de la respiration mitochondriale pour l'ADP (K_m élevé), le signal pour la respiration est la créatine; (3) des transferts d'énergie couplés dans la cellule entre les mitochondries et les ATPases par la navette des CK. (D'après Ribera et al., 2003).



Kaasik et al., ont montré que l'ATP mitochondrial est presque aussi efficace que l'ATP venant de la réaction de la CK pour stimuler la respiration mitochondriale, ces 2 sources d'ATP étant plus efficaces que l'ATP exogène, suggérant l'existence d'une canalisation directe ATP/ADP entre la mitochondrie, le RS et les myofibrilles. Il existerait donc des interactions directes entre ces organelles permettant d'expliquer la préservation de la fonction cardiaque chez les animaux déficients en CK cytosolique et mitochondriale (Kaasik et al., 2001). Ces observations de Kaasik confirment l'hypothèse d'une organisation en ICEUs où structure et fonction sont intimement liées.

Ainsi le système des CK participe activement au concept de système métabolique organisé où les enzymes sont contrôlées par leur micro environnement ainsi que par d'autres composants du même système. Un système de canalisation directe des substrats et des produits se met en place, permettant de diminuer les distances diffusion entre les intermédiaires et les temps de transit entre les différentes séquences de réactions enzymatiques grâce à une organisation structurale en complexes multienzymatiques. Cette vitesse de réaction élevée peut être atteinte dans ces systèmes de couplage indépendamment de la concentration moyenne des substrats et des intermédiaires. Ainsi la cellule possède plusieurs microcompartiments métaboliques qui sont, par définition, des situations dans lesquelles le métabolite passe d'une enzyme à l'autre et ne se mélange pas avec la réserve totale en métabolites du même macrocompartiment. Ces problèmes de compartimentation intracellulaire sont directement reliés aux problèmes de diffusion intracellulaire. Il a été prouvé qu'il existe des microcompartiments au niveau sous sarcolemmal et myofibrillaire, mais il n'est pas exclu que des microcompartiments dynamiques existent également grâce à des associations transitoires des enzymes cytoplasmiques incluant les enzymes glycolytiques et les CK (Saks et al., 1994).

Dans la préparation des fibres perméabilisées, l'effet stimulant de la créatine sur la respiration stimulée par l'ADP indique le couplage fonctionnel entre la MiCK et l'ANT en régénérant localement de l'ADP. Cet ADP produit par la MiCK au voisinage de l'ANT entre dans la matrice mitochondriale pour être rephosphoryler et activer la respiration. Ce cycle est répété plusieurs fois et c'est la raison pour laquelle la vitesse de respiration augmente pour des concentrations en ADP inférieures en présence de créatine comparée à celle sans créatine.

La PCr diffuse hors de la mitochondrie, trouve les CK myofibrillaires et donc produit localement de l'ATP. Ceci active les ATPases et reproduit de l'ADP endogène dans les myofibrilles. Celui-ci est produit après de longues chaînes de réactions et repart vers l'ANT. En chemin, il peut éventuellement sortir dans le milieu. Donc, puisque les mitochondries sont

activées et produisent de la PCr, cette PCr peut de nouveau rephosphoryler cet ADP déjà dans les myofibrilles et le cycle repart dans le compartiment myofibrillaire sans que l'ADP puisse repartir pour activer la mitochondrie. C'est la situation observée lors de l'étude de l'ATP exogène qui va activer la production d'ADP à la fois dans la mitochondrie et dans les myofibrilles et dans ces expériences, seul l'ADP endogène est suivi même si la créatine est absente.

La nature exacte des barrières de restrictions de diffusion n'est pas déterminée et la manière dont l'ADP endogène est canalisé non plus. Les ICEUs sont organisées par les interactions entre les mitochondries, le réticulum sarcoplasmique et les sarcomères avec le cytosquelette. Le problème se pose alors de déterminer quels composants du cytosquelette sont responsables de l'architecture intracellulaire.

A.6. Le cytosquelette

Le cytosquelette est un réseau complexe de filaments et de tubules qui transmettent des stimuli mécaniques et chimiques au sein et entre les cellules (Choquet et al., 1997 ; Wang et Ingber., 1994). Il contribue à la stabilité cellulaire en ancrant les structures subcellulaires, comme les mitochondries, l'appareil de Golgi, les noyaux et les myofibrilles. Le cytosquelette cellulaire est composé de 3 systèmes filamenteux : microfilaments (MF), filaments intermédiaires (IF) et microtubules (MT).

(I). Les microfilaments sont des structures faites de molécules globulaires d'actine et sont communs à toutes les cellules eucaryotes. Les microfilaments contenant de l'actine jouent un rôle essentiel dans la détermination de la forme de la cellule, dans la locomotion et la contractilité. Dans l'unité contractile du muscle squelettique, c'est-à-dire le sarcomère, les filaments fins sont interconnectés et alignés au niveau de structures spéciales, les stries (ou disques) Z (Fürst et Gautel., 1995 ; Young et al., 1998). Un constituant des stries Z, des corps denses et des régions denses est l' α -actinine, une protéine liant l'actine et impliquée dans l'arrangement des filaments d'actine (Geiger et al., 1981 ; Langanger et al., 1984 ; Chou et al., 1994 ; Young et al., 1998). Plusieurs autres composants des stries Z, mis à part l' α -actinine, ont été identifiés (Fürst et Gautel., 1995 ; Young et al., 1998). Les longues chaînes de molécules d'actine forment des hélices α qui forment à leur tour des microfilaments individuels. Au moins 6 types différents d'actine sont synthétisés par les vertébrés : 4 α -

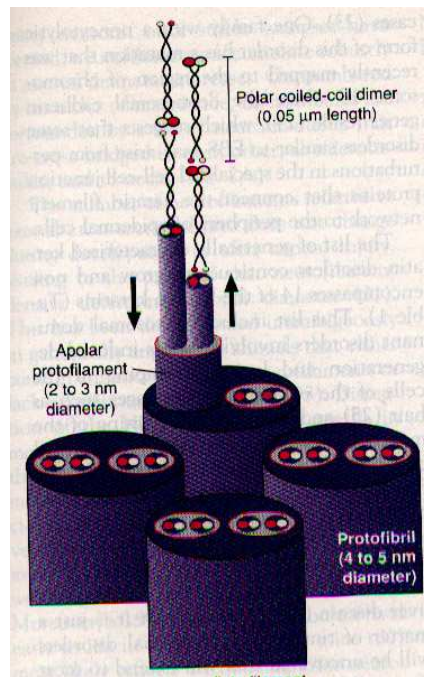
actines (squelettique, cardiaque, vasculaire et entérique) sont trouvées dans les structures sarcomériques, tandis que les actines β et γ seraient principalement cytoplasmiques (Stromer, 1998). Cependant, leurs séquences d'acides aminés sont hautement conservées et elles ont des propriétés similaires. Les filaments d'actine consistent de 2 monomères d'actine polymérisés vrillés en une hélice de 13.5 molécules par tour (Amos, 1985).

(II). Le second groupe de filaments, les filaments intermédiaires peuvent stabiliser les organelles comme le noyau ou peuvent être impliqués dans des jonctions spécialisées. Ils sont distingués des microfilaments par leur taille (8-10 nm) (Heins et al., 1993) et le fait que les microfilaments sont évidemment mobiles. Cependant, des études récentes indiquent que les IF peuvent également avoir des propriétés dynamiques. Il y a cinq types de filaments intermédiaires (http://www.cytochemistry.net/Cell-biology/intermediate_filaments.htm) :

Types 1 et 2. Kératine acide et basique respectivement. Produits par différents types de cellules épithéliales (peau, etc.). Type 3. Les IF sont distribués dans plusieurs types cellulaires incluant : la vimentine dans les fibroblastes, les cellules endothéliales et les leucocytes ; la desmine dans les cellules musculaires, le facteur acide glial fibrillaire dans les astrocytes et la périphérine dans les fibres nerveuses périphériques. Type 4. Les neurofilaments (H : lourd (heavy); M : moyen (medium) ; et L : léger (low)). Un autre IF de type 4 est l'internexine et quelques types 4 non standard sont trouvés dans les fibres optiques de l'œil (filensine et phakinine). Type 5. Les lamines qui ont une séquence de signal nucléaire pour former un support filamentueux à l'intérieur de la membrane interne nucléaire. Les lamines sont indispensables à la reformation de l'enveloppe nucléaire après la division cellulaire.

Les protéines associées aux IF peuvent lier ces filaments (en faisant des ponts pour améliorer la stabilité), ou ils peuvent lier des filaments d'autres structures. En dépit de leur diversité, les membres de la superfamille des IF partagent une structure commune : un dimère composé de 2 hélices α orientées en parallèle (Fig. 25).

Fig. 25. Modèle structural d'un filament intermédiaire (IF). Les dimères polarisés d'IF forment des tétramères antiparallèles qui s'associent longitudinalement et latéralement en protofilament apolaire de 2 à 3 nm de diamètre puis en protofibrilles de 4 à 5 nm de diamètre. De 2 à 4 protofibrilles (4 ici) s'associent pour fournir un arrangement composé d'approximativement de 16 à 32 polypeptides en coupe. (D'après Fuchs et Cleveland., Science, 1998).

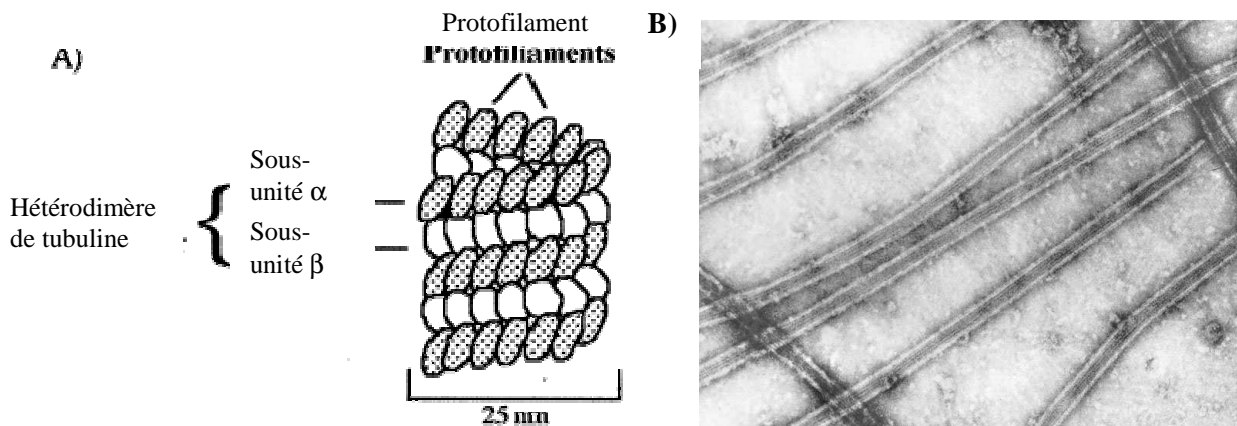


Ce mécanisme de dimérisation par une interaction 'coiled-coil' est maintenant trouvé universellement en biologie. Les extrémités (très conservées) de la tige des IF associées en « tête à queue », et les mutations des ces extrémités ont des conséquences délétères pour les processus d'assemblage de la plupart si ce n'est pas de tous les IF (Albers et Fuchs., 1987 ; Letai et al., 1992 ; Geisler et al., 1983). L'association de ces dimères résulte en des rangées linéaires, quatre dimères s'associant de manière antiparallèle, pour produire les protofibrilles et 3 à 4 protofibrilles s'accolent pour former un filament intermédiaire apolaire de 10 nm de diamètre (Fuchs et Weber., 1994). Bien que les IF partagent des structures similaires, leurs propriétés sont assez uniques.

(III). Les microtubules forment un réseau de transport dans la cellule. Ils déplacent les vésicules, les granules, les organelles (mitochondries), les chromosomes par des protéines spéciales d'attachement. Ils jouent également un rôle dans le cytosquelette. Structuralement, ce sont des polymères linéaires de tubuline, une protéine globulaire. Ces polymères linéaires sont appelés des protofilaments. Les microtubules consistent en une association de 13 protofilaments et possèdent un diamètre de 25 nm, chaque mm de longueur de microtubule étant composée de 1650 hétérodimères (Fig. 26).

Fig. 26. Représentation schématique d'un microtubule (A) et assemblage *in vitro* visualisé par micrographie électronique (B). (A) Les MT sont des fibres fortement ordonnées qui ont une polarité intrinsèque, montrée schématiquement dans la figure. (B). Microtubules assemblés

in vitro à partir de tubuline en présence de protéines associées aux microtubules (MAP1, MAP2, tau).
 Micrographie électronique à transmission, préparation entière, marquage à l'acétate d'uranyl. (D'après [K.J. Böhm, Institute of Molecular Biotechnology, Jena, Germany](#)).



La tubuline peut polymériser par les 2 extrémités *in vitro*, cependant, le taux de polymérisation n'est pas équivalent. Par convention, on appelle l'extrémité qui se polymérise le plus rapidement l'extrémité positive du microtubule et l'extrémité de polymérisation lente l'extrémité négative. *In vivo*, l'extrémité positive du microtubule est distante du centre d'organisation du MT.

La famille de la tubuline inclus de nos jours l' α - et la β -tubuline, qui sont les principales sous-unités des MT eucaryotes ; la γ -tubuline, qui est responsable de la nucléation des MT et régule la dynamique de leur extrémité négative (Joshi, 1994 ; Oakley, 1995) ; et FtsZ un homologue procaryote des tubulines qui est la protéine majeure de la division cellulaire bactérienne (Erickson, 1995). Il existe deux nouveaux membres de la famille des tubulines, la δ - et l' ϵ -tubuline dont la séquence a été déduite de bases de données (Burns, 1995) mais ces protéines n'ont toujours pas été identifiées. A la fois l' α/β tubuline et FtsZ (Erickson, 1996) s'assemblent en protofilaments pouvant s'associer pour former des protofilaments en 2D. Le protofilament α/β forme ainsi la paroi du MT. Les familles d' α - et de β -tubuline consistent de différents isotypes, hautement conservés, différentiellement exprimés et modifiés post-translationnellement (Little et Seehaus., 1988 ; Mandelkow et Mandelkow., 1995). Le GTP échangeable lié à la sous-unité β est hydrolysé en GDP lors de l'assemblage. La tubuline liée au GDP est inactive pour l'assemblage des MT et peut facilement former des anneaux reliés aux protofilaments courbés des extrémités de MT qui se

dépolymérisent. (Melki et al., 1990 ; Diaz et al., 1994). Deux classes majeures de protéines (MAP, Microtubule Associated Proteins) interagissent avec les polymères de MT : les moteurs moléculaires et les protéines associées aux MT, régulées par la phosphorylation. Contrairement aux moteurs moléculaires, les MAP se lient aux MT de manière nucléotide indépendante. Elles copolymérisent avec les MT à travers des cycles d'assemblage et de désassemblage, stimulant leur nucléation et stabilisant les polymères (Olmsted, 1991 ; Schoenfeld et Obar., 1994 ; Mandelkow et Mandelkow., 1995).

A.6.1. Le cytosquelette dans les cellules musculaires

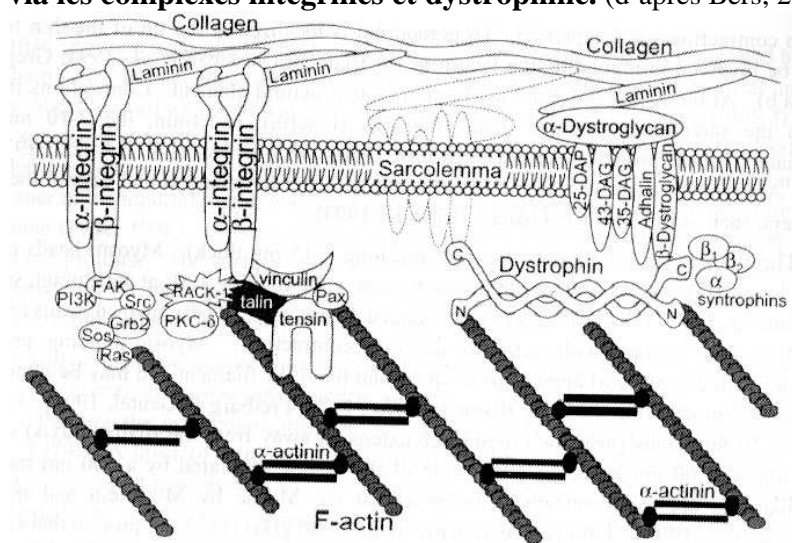
Les protéines qui contribuent à la forme de la cellule, la résistance mécanique et l'intégrité morphologique des cardiomyocytes peuvent être subdivisées sur la base de leur structure et de leurs propriétés fonctionnelles en 4 groupes différents (Kostin et al., 1998) :

1. Le squelette sarcomérique : titine, protéine-C, α -actinine, myoméline et protéine-M.
2. les « vraies » protéines du cytosquelette : tubuline, actine et desmine.
3. Les protéines associées aux membranes : dystrophine, spectrine, taline, vinculine et ankyrine.
4. Les protéines des disques intercalés : desmosomes consistant de desmoplakine, desmocolline, desmogléine et jonctions adhérentes de desmine avec les N-cadhérines, caténines et vinculine et les « gap junctions » avec la connexine.

L'action du cytosquelette comme force de stabilisation et mécano-transducteur est appuyée par les protéines associées aux membranes, en particulier la dystrophine qui lie à la fois l'actine intracellulaire et la laminine extracellulaire (Klietsch et al., 1993). Un système de lien cytosquelette-intégrines existe et permet à la cellule de répondre aux signaux physiques et biochimiques envoyés par la matrice extracellulaire. Le cytosquelette forme des connections avec la matrice extracellulaire par des intégrines sur des sites proches des disques Z connus sous le nom de costamères (Fig. 27). Quand la matrice résiste au mouvement, le lien avec le cytosquelette est renforcé par un nombre croissant d'intégrines (Choquet et al., 1997). Des composants du cytosquelette, c'est l'actine qui joue un rôle principal à cet égard bien que les MT et les IF pourraient aussi être impliqués (Wang et al., 1993 ; Maniotis et al., 1997). Plusieurs des protéines s'associant aux intégrines au niveau des costamères sont capables de lier l'actine, comme par exemple : la vinculine, l' α -actinine, la taline et la paxilline (Borg et al., 2000 ; Samuel et al., 2000). Ces protéines maintiennent l'organisation du cytosquelette d'actine de la cellule en liant les MF entre eux favorisant de nouveaux liens avec le sarcolemme et régulant la longueur des filaments (Raman et Atkinson, 1999). D'autres

protéines liées aux membranes tel que le β -dystroglycan forme des connections avec le cytosquelette d'actine via la dystrophine (Kaprielian et al., 2000). Par exemple, Rybakova et al (2000) ont montré un modèle costamérique de l'actine G dans les muscles squelettiques adulte qui était absent chez la souris déficiente en dystrophine. Dans les muscles squelettiques lents, l'absence de dystrophine est associée au réarrangement de l'énergie intracellulaire et aux systèmes de régulation du transfert énergétique entre les mitochondries et les ATPases (Braun et al., 2001).

Fig. 27. Schéma indiquant les connections entre le cytosquelette d'actine et la matrice extracellulaire via les complexes intégrines et dystrophine. (d'après Bers, 2002)



Dans de nombreuses études ultrastructurales des cellules utilisant la microscopie électronique, des connections entre les mitochondries et des éléments du cytosquelette ont été observées depuis 1967 (Bucley et Porter., 1967 ; Lazarides et Granger., 1982 ; Watkins et al., 1987 ; Lockhard et Bloom., 1993 ; Leterrier et al., 1994 ; Bereiter-Hahn et Voth., 1994 ; Penman, 1995 ; Rappaport et al., 1998). Les résultats de ces travaux montrent de multiples connections entre le cytosquelette et les membranes mitochondriales, importantes pour la localisation des mitochondries dans les cellules et l'organisation structurale des systèmes cellulaires. Ces contacts pourraient être important pour le contrôle d'une partie de la fonction mitochondriale telle que l'affinité pour l'ADP cytosolique comme cela est discuté plus tard.

6.1.1. Le cytosquelette d'actine dans le cœur

De l'actine sarcomérique et non sarcomérique distincte peut être observée à la fois dans des myocytes néonataux et adultes en culture (Sadoshima et al., 1992 ; Messerli et Perriard., 1995 ; Larsen et al., 1999, 2000). Il semble en effet, que ces structures non

sarcomériques soient nécessaires pour la propagation cellulaire et la génération de nouvelles myofibrilles (Rothen-Rutishauser et al., 1998). Néanmoins, l'imagerie immunocytochimique de l'actine dans des cardiomyocytes isolés adultes ne révèle que l'arrangement sarcomérique (Messerli et Perriard., 1995 ; Kostin et al., 1998), même en utilisant des anticorps anti β -actine, un des isomères d'actine cytosolique (observé dans le cytosquelette cortical diffus d'actine de myocarde de rat adulte) dont la quantité augmente avec l'hypertrophie (Yang et al., 2002). Ces auteurs ont également montré que, soit en déstabilisant (cytochalasin D) ou stabilisant (phalloïdine) le composant subsarcolemmal des microfilaments d'actine non myofibrillaire la configuration des potentiels d'action est altérée. Une hypothèse est que le cytosquelette d'actine pourrait avoir un rôle important dans la modulation de l'activité électrique du cœur car dans les myocytes néonataux et en culture le réseau de filaments d'actine peut être visiblement visualisé. En dépit du manque de preuves de la modulation du potentiel d'action par le cytosquelette d'actine, il y a, à ce jour, des résultats sur ses effets sur des courants ioniques cardiaques où la conclusion est la modulation de l'activité des canaux par le cytosquelette d'actine non sarcomérique (Calaghan et al., 2004). Il y a des différences entre l'actine costamérique (cytosquelette) dans les cellules en culture et le myocarde intact (Calaghan et al., 2004). Dans les cellules cultivées sur une matrice extracellulaire de substrats, l'actine est toujours présente aux sites d'adhésion focaux au niveau des costamères cependant, elle n'a pas été détectée comme faisant partie de l'axe matrice extracellulaire-intégrines dans le myocarde intact (Borg et al., 2000).

La cytochalasine D est l'agent pharmaceutique le plus utilisé pour étudier le cytosquelette d'actine. La cytochalasine B a également été utilisée pour détruire le réseau d'actine (Dick et Lab., 1998). D'autres agents incluant la lantrunculine A, la DNAase I, la gelsoline et la cofiline, peuvent aussi détruire le cytosquelette d'actine.

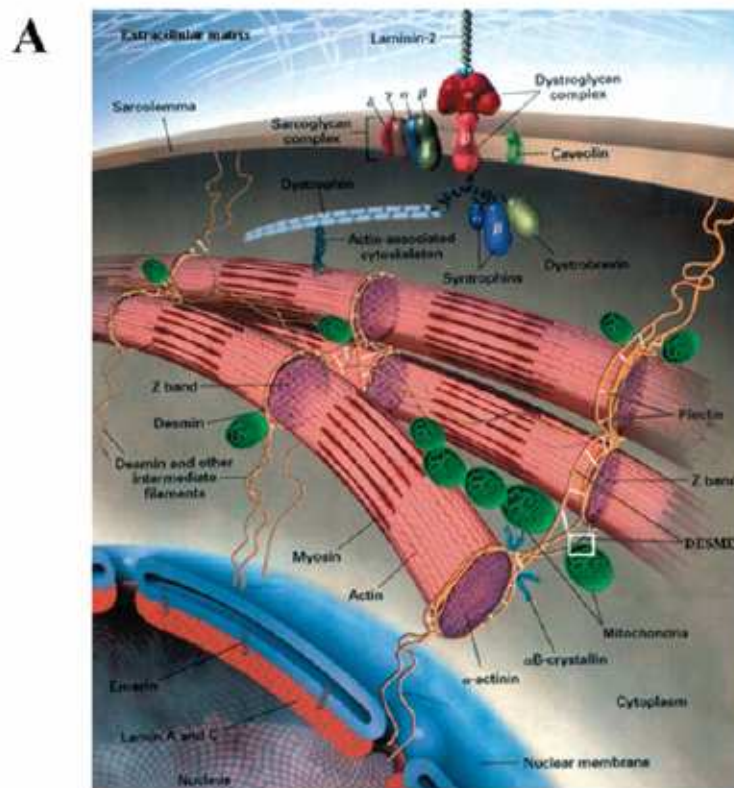
Donc la structure du cytosquelette d'actine dans le myocyte adulte est bien caractérisé et possède des différences marquées entre la distribution et la densité des microfilaments d'actine dans les cardiomyocytes en culture et néonataux comparés aux cellules adultes, ou au myocarde intact. A cause des difficultés de visualisation de l'actine cytosquelettique, la vérification des effets pharmacologiques ou des altérations observées en conditions pathologiques restent problématiques (Kostin et al., 1998).

6.1.2. Les filaments intermédiaires : la desmine

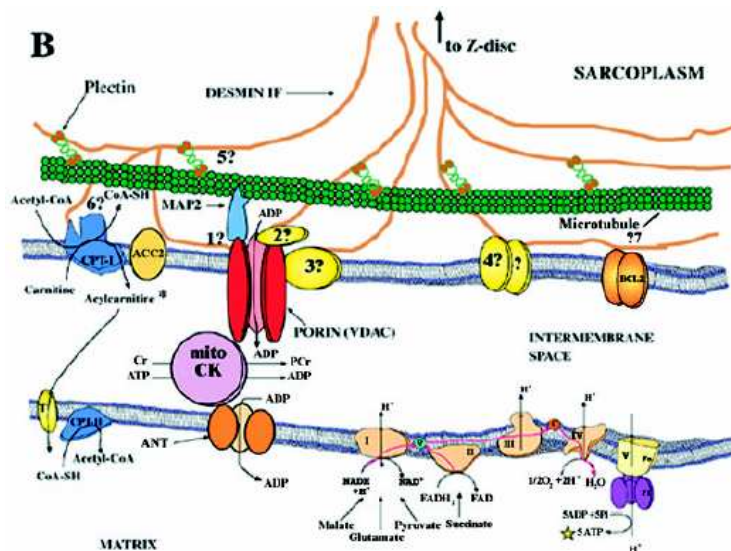
La desmine forme le composant majoritaire des IF du cœur qui établit une liaison entre le noyau, les protéines contractiles (en entourant les disques Z), le sarcolemme et la matrice

extracellulaire via les costamères. Ils peuvent aussi avoir la possibilité de s'associer avec d'autres organelles comme les mitochondries et le RS (Capetanaki, 2002) (Fig. 28). Leur distribution cellulaire fait d'eux un excellent candidat pour acheminer les signaux en dedans et en dehors des cellules.

Fig. 28. Le cytosquelette dans les cellules cardiaques. Représentation schématique de l'assemblage des associations potentielles avec les mitochondries. Représentation schématique des IF de desmine dans les muscles striés (A), et associations potentielles avec les mitochondries (B). (A) IF de desmine (orange) entourant les disques Z, les interconnectant entre eux, et liant l'appareil contractile entier aux différents compartiments membranaires et organelles incluant le sarcolemme, les mitochondries et le noyau. Ceci permet la formation d'un réseau continu entre la matrice extracellulaire et la matrice nucléaire. Les liaisons potentielles avec le RS et les tubules T ne sont pas représentées. Le carré blanc représente l'association mitochondrie-desmine élaborée en (B).



(B) Schéma soulignant comment le cytosquelette de desmine pourrait s'associer avec des sites de contact mitochondriaux et potentiellement influencer la stabilité membranaire et la fonction mitochondriale. Ces sites sont des structures dynamiques qui impliquent une fusion des membranes interne et externe mitochondriales (la fusion n'est pas montrée ici), et sont des participants clés dans le transport de protéines, le couplage énergétique avec le cytosol via la formation de PCr et le captage des acides gras pour le métabolisme oxydatif. (D'après Capetanaki, 2002).



La molécule de desmine est organisée en 3 domaines : un domaine tige en hélice α très conservé entouré d'une tête non hélicoïdale et de domaines de queue. La tige consiste en 4 segments en hélices α , 1A, 1B, 2A et 2B interrompus par des liens (Fuchs et Weber., 1994). Les souris déficientes en desmine montrent de sévères atteintes de l'architecture musculaire dans le myocarde et les muscles squelettiques (Li et al., 1996). Des mutations de la desmine causent un assemblage défectueux de filaments (Munoz-Marmol et al., 1998 ; Park et al., 2000), la destruction du réseau préexistant de filaments endogènes d'autres IF (Sjoberg, 1999) et l'accumulation d'agrégats chimériques intracellulaires (Li et Dalakas., 2001 ; Wang et al., 2001).

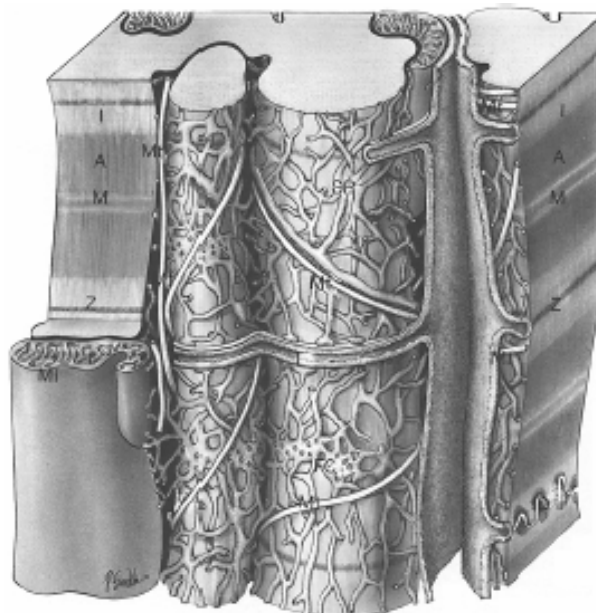
Les IF s'associent de manière prédominante avec les mitochondries et cette association a été trouvée dans divers types cellulaires (Capetanaki, 2002 ; Rappaport et al., 1998). L'absence de desmine conduit à la perte non seulement de la distribution des mitochondries mais aussi de leur nombre, de leur morphologie et de leur fonction (Milner et al., 2000). De plus, une calcification excessive des cœurs de souris desmine K/O (Mavroidis et Capetanaki., 2002 ; Weisleder et al., 2004) pourrait être directement liée à l'homéostasie normale du Ca^{2+} ou être la conséquence d'une mort cellulaire importante initiée par une voie indépendante du Ca^{2+} liée aux mitochondries. Afin d'étudier le rôle possible des filaments de desmine dans le contrôle des mitochondries, des souris transgéniques déficientes en desmine ont été utilisées (Kay et al., 1997). Des cardiomyocytes fantômes, contenant en partie des mitochondries, du RS et le cytosquelette de desmine, qui gardent une forme normale, ont montré des valeurs élevées du K_m apparent pour l'ADP. Dans ces cellules fantômes, les anticorps anti-desmine n'ont pas modifié la régulation des cinétiques de respiration par l'ADP. Cependant, dans les fibres perméabilisées de cœur et de soléaire de souris

transgéniques, des modifications de la régulation de la respiration par l'ADP ont été observées (Kay et al., 1997). Des observations morphologiques par microscopie électronique ont confirmé l'existence de 2 populations cellulaires distinctes dans les cellules musculaires de souris transgéniques. La desmine elle-même ne contrôle pas les VDAC mitochondriaux mais son absence entraîne l'apparition de cellules désorganisées avec une population de mitochondries altérées dépourvues probablement du facteur protéique contrôlant VDAC.

6.1.3. Les microtubules dans les cellules musculaires

Les microtubules sont des cylindres creux d'hétérodimères d' α - et de β -tubuline d'environ 25 nm de diamètre (Goldstein et Entman., 1979 ; Rappaport et Samuel., 1988) alignés de façon prédominante le long de l'axe longitudinal des myocytes adultes (Kostin et al., 2000) (Fig. 29). Le système-T est essentiel pour le travail ventriculaire des cardiomyocytes ; alors que la densité de volume de ce système est de 1-2%, il représente environ 1/3 de l'aire des membranes cellulaires (Severs et al., 1985). Dans les muscles cardiaque et squelettiques, le système-T est nécessaire pour la propagation rapide du signal d'excitation à travers la fibre musculaire (Sommer, 1995).

Fig. 29. Représentation schématique du muscle cardiaque illustrant les profils des MT. A : bande A ; I : bande I ; M : bande M ; Z : bande Z ; ID : disque intercalé ; Mt : microtubule ; Mi : mitochondrie ; SR : réticulum sarcoplasmique ; T : tubule-T. (d'après Goldstein et Entman., 1979).



Un turnover constant des MT se produit par polymérisation et dépolymérisation. Dans les cardiomyocytes, 30% seulement de la tubuline totale est présente sous forme polymérisée

de MT alors que 70% est sous forme non polymérisée cytosolique (Tagawa et al., 1998). Les MT sont associés aux protéines liant le GTP comme Gi et Gs (Rasenick et al., 1981, 1990), aux MAP qui assurent la stabilisation des MT (MAP4, majoritaire dans le cœur), à la protéine Tau, à des kinases (Pitcher et al., 1998) et à des moteurs moléculaires comme les kinésines (Olmsted, 1986 ; Liao et Gundersen., 1998). Les MT s'associent également à d'autres composants du cytosquelette comme l'actine (Cunningham et al., 1997) et les IF (Gurland et Gundersen., 1995). Les MAP sont capables de réorganiser à la fois les filaments d'actine et les MT (Cunningham et al., 1997).

Les agents les plus utilisés pour manipuler le cytosquelette de MT sont : la colchicine, qui entraîne la destruction des MT et le taxol qui est responsable au contraire de leur prolifération et de leur stabilisation. Les études par immunocytochimie et western blot ont montré que l'exposition des cardiomyocytes adultes à la colchicine conduit à une diminution des MT intacts et une augmentation de la tubuline libre (Tsutsui et al., 1994 ; Calaghan et al., 2001 ; Kerfant et al., 2001), alors que le taxol (10 mM, 2-4h) a l'effet opposé (Tsutsui et al., 1994; Howarth et al., 1999). Le taxol diminue le flux de Ca^{2+} dans les myocytes ventriculaires de rat (Howarth et al., 1999). Cette réduction du flux de Ca^{2+} est du, en partie, à un plus faible relargage de Ca^{2+} du RS (Howarth et al., 1999). La publication de Kerfant (2001) présentant l'analyse des flux de Ca^{2+} lors de l'altération des MT, montre une augmentation de ces flux après un traitement prolongé à la colchicine.

Parallèlement à un manque d'effet sur les flux de Ca^{2+} en l'absence de prolifération antérieure de MT, la désorganisation du réseau de MT par la colchicine ne module pas significativement l'activité contractile adulte du muscle cardiaque ou des myocytes (Tsutsui et al., 1994 ; Ishibashi et al., 1996 ; Tagawa et al., 1998 ; Takahashi et al., 1998 ; Hongo et al., 2000 ; Calaghan et al., 2001). Cependant, contrairement à ces études, il a été également montré que dans les myocytes ventriculaires de rat, la colchicine diminue l'amplitude des Ca^{2+} sparks et augmente l'amplitude globale du flux de Ca^{2+} .

Le cytosquelette microtubulaire a été mis en cause dans de nombreuses conditions pathologiques. La désorganisation de ce réseau a été observé dans l'ischémie (Hori et al., 1994 ; Hein et al., 1995), des dommages cellulaires irréversibles peuvent être associés à l'effondrement des MT (Iwai et al., 1990). La prolifération des MT avec le taxol protège contre les dommages engendrés par l'hypoxie/ré-oxygénation (Skobel et Kammermeier., 1997), tandis que la colchicine abolit les bénéfices du préconditionnement ischémique (Sharma et Singh., 2000 a, b).

Les MT sont reliés au système β -adrénergique dans le cœur (Palmer et al., 1998) et sont impliqués dans le signal du récepteur β -adrénergique (Rasenick et al., 1990). Le rôle des MT dans la régulation du système β -adrénergique dans le muscle cardiaque adulte est sujet au débat (Calaghan et al., 2004). Les MT et les mitochondries semblent être en proche relation, et l'on pourrait s'attendre à des jonctions spécifiques entre les composants des membranes externes mitochondriales et les composants des MT. Les interactions mitochondries-MT sont spécifiques et apparaissent dans tous les types cellulaires (Bernier-Valentin et Rousset., 1982). Les résultats de Saetersdal et ses collaborateurs indiquent la présence d'une β -tubuline spécifique se liant à la membrane externe mitochondriale qui implique probablement les translocateurs à la base des MT et/ou les MAP (Saetersdal et al., 1990). Des domaines spécialisés des membranes mitochondriales sont impliqués dans des associations avec les MT médiées par les MAP (Leterrier et al., 1994).

6.1.4. Les microtubules associated-proteins : la protéine STOP

Les microtubules possèdent un comportement dynamique observé *in vivo*. Cependant, les MT cytoplasmiques ont des propriétés différentes de celles des MT de pure tubuline (assemblés *in vitro*). En effet, les microtubules de pure tubuline se dépolymérisent lorsqu'ils sont exposés au froid ou lorsque les suspensions sont diluées dans un grand volume de tampon. En revanche, des microtubules résistants au froid et aux dilutions sont souvent observés dans les cellules vivantes (Bershadsky et al., 1979; Lieuvin et al., 1994). En premier lieu, cette stabilité a été étudiée dans le cerveau par Webb et Wilson (Webb et Wilson., 1980). Il a été trouvé que le facteur de stabilisation ne dénature pas les MT et qu'il ne s'agit pas de la tubuline. Par la suite, les travaux du laboratoire de Margolis ont révélé que la stabilité des MT était abolie si les polymères stables étaient exposés au Ca^{2+} -calmoduline (Job et al., 1981). Plus récemment, il a ainsi été montré que dans une grande variété de types cellulaires, la stabilité des microtubules au froid résultait de l'association du polymère avec une famille de protéines régulées par la calmoduline (et pouvant la lier) appelées les protéines STOP (Stabilizing Tubule Only Polypeptide). Ces protéines peuvent bloquer de manière réversible et transitoire la dynamique des microtubules.

Les protéines STOP sont encodées par un seul gène mais il existe plusieurs isoformes tissu ou développement spécifiques. Ce gène est situé sur le chromosome 1q32, 7 E2-F1, 11q14 chez le rat, la souris et l'Homme respectivement (Denarier et al., 1998a). Les neurones contiennent les isoformes principales N-STOP et E-STOP.

L'isoforme N-STOP (« neuronal STOP ») chez le rat a un poids moléculaire de 125-145 kDa dépendant des conditions de SDS PAGE.

L'isoforme E-STOP (« early STOP ») est une variante de STOP spécifique des neurones avec un poids moléculaire de 84 kDa chez le rat (Guillaud et al., 1998). Cette isoforme est prédominante dans le cerveau d'embryon de rongeur et persiste à l'âge adulte

D'autres types cellulaires contiennent une isoforme moins abondante : F-STOP (« fibroblastic STOP ») de masse moléculaire de 42 kDa (Denarier et al., 1998b). F-STOP est largement répandue dans les tissus de souris (Aguzzoul et al., 2003). A température physiologique, contrairement à N- et E-STOP, la protéine F-STOP n'est pas liée aux microtubules.

Les souris mutantes STOP (-/-) sont viables mais souffrent de graves troubles au niveau synaptique. En effet, elles possèdent un pool de vésicules synaptiques plus faible et une plasticité synaptique altérée en comparaison des souris sauvages. Par ailleurs, elles ont de sévères troubles du comportement qui sont atténués par un traitement neuroleptique (Andrieux et al., 2002). De plus, le gène humain codant pour STOP, situé à la position 11q14, se trouve dans une région qui a été reliée à des maladies mentales incluant les troubles schizophrènes (St. Clair et al., 1990; Brzustowicz et al., 2000).

A ce jour, aucune information n'est connue quant au rôle physiologique des protéines STOP et aucune étude n'a porté sur cette protéine dans les cellules musculaires.

A.6.2. Les phénomènes de fission et fusion des mitochondries

Les mitochondries sont des structures dynamiques qui se divisent fréquemment et peuvent fusionner entre elles (Scheffler, 1999 ; Griparic et van der Bliek., 2001).

La division mitochondriale est requise lors de la division cellulaire pour distribuer les mitochondries entre les cellules filles. Les cellules quiescentes montrent également une division mitochondriale durant la différenciation et la croissance cellulaire ou en réponse à des stimuli extracellulaires.

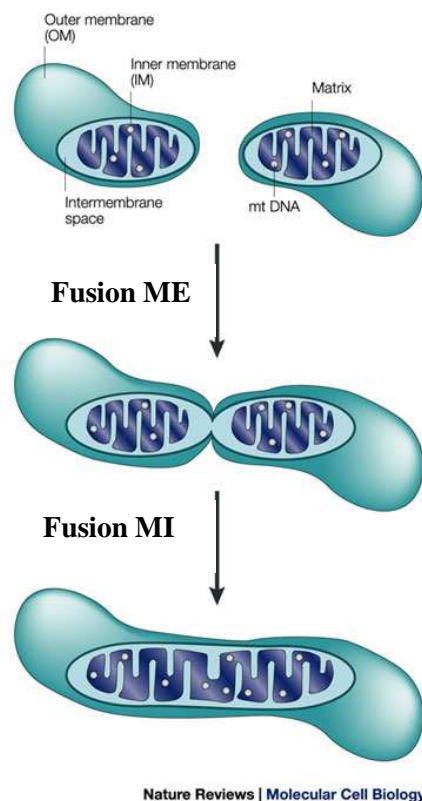
La fusion mitochondriale, quant à elle, est importante pour de nombreuses fonctions biologiques (Westermann, 2002). La fusion s'oppose à la fission pour maintenir une morphologie tubulaire des mitochondries, nécessaire à des fonctions mitochondriales optimales (Sesaki et Jensen., 1999 ; Bleazard et al., 1999). Quand la fusion est bloquée, les phénomènes de fission continus entraînent une fragmentation du réseau mitochondrial. Dans les levures en bourgeonnement, ces fragments perdent l'ADN mitochondrial et deviennent incompetents sur la plan de la respiration (Hermann et al., 1998 ; Sesaki et Jensen., 2001).

Chez l'Homme, la fragmentation mitochondriale peut être reliée à une pathologie : l'atrophie optique dominante causant la cécité chez les enfants (Alexander et al., 2000). La fusion est importante pour d'autres fonctions dans des types cellulaires spécialisés. Par exemple, la fusion entre les mitochondries peut transférer le potentiel membranaire des régions riches en oxygène aux régions pauvres en oxygène dans les fibres musculaires (Skulachev, 2001).

Ainsi, les processus de division et de fusion mitochondriales doivent être finement régulés, car la survie cellulaire dépend de la préservation d'un nombre adéquat de mitochondries dans chaque cellule. Les mécanismes de la division et de la fusion sont susceptibles d'être complexes car la mitochondrie possède 2 membranes ce qui présente des barrières énergétiques et topologiques distinctes.

Contrairement à la fusion d'une membrane unique, la fusion mitochondriale doit faire intervenir séquentiellement une machinerie pour faire fusionner les membranes externe et interne (Fig. 30). Ces événements coordonnés sont le fait chez la drosophile d'une GTPase transmembranaire Fzo (Hales et Fuller., 1997) qui possède des homologues de la levure aux humains. La dynamine et les « dynamine-related proteins » ou DRP forment une petite famille de GTPases impliquées dans la dynamique des membranes. Ainsi la dynamine joue un rôle dans le phénomène d'endocytose en intervenant dans la scission des vésicules de clathrine (van der Bliek et Meyerowitz., 1991). Ce groupe de chercheurs a également mis en évidence plus récemment que la « dynamine-related protein » DRP-1 de *C. elegans* et son homologue humain Drp1 (aussi connu sous le nom de Dlp1, Dvlp1 ou Dymple) sont spécifiquement nécessaires pour la division de la membrane externe mitochondriale (Labrousse et al., 1999 ; Smirnova et al., 2001). Ces auteurs soulèvent également l'hypothèse que l'endocytose et la division mitochondriale auraient une origine commune (van der Bliek, 2000).

Fig. 30. Fusion mitochondriale — un cas unique de fusion membranaire. Les mitochondries ont 2 membranes — une membrane externe (ME) et une membrane interne (MI). Ces membranes délimitent l'espace intermembranaire et le compartiment matriciel. Pour maintenir l'intégrité des compartiments, les mitochondries doivent fusionner à la fois leur ME et leur MI de manière coordonnée et séquentielle. En premier lieu, les bicouches de la ME sont juxtaposées. Un mélange de lipides entre les ME aboutit à la fusion des ME et un espace intermembranaire continu. Ensuite, les bicouches de MI établissent un contact et fusionnent, conduisant à la continuité de la matrice et à la complète fusion des mitochondries. Cette fusion de 4 bicouches lipidiques demande un vrai challenge de la machinerie mitochondriale qui n'est pas relevé par la plupart des protéines intracellulaires de fusion de membrane qui fusionnent seulement deux bicouches de lipides (bien que l'enveloppe nucléaire soit constituée de 2 membranes, ces membranes sont continues aux pores nucléaires, donc, théoriquement, un seul événement de fusion initié à un site de continuité membranaire pourrait fusionner les 2 membranes). mtDNA, ADN mitochondrial. (D'après Modzy et Shaw., 2003).



6.2.1. Fission et fusion mitochondriale dans le muscle cardiaque et squelettique

Des contacts intermitochondriaux ont été décrits dans les cardiomyocytes de rat. Ils sont caractérisés par une forte augmentation de la densité d'électrons au niveau des membranes externe et interne mais aussi de l'espace intermembranaire de deux mitochondries voisines. Ces contacts mitochondriaux connectent toutes les mitochondries de la cellule cardiaque. (Bakeeva et al., 1983).

De plus, dans beaucoup de types cellulaires et en particulier dans les muscles, les mitochondries forment des filaments allongés ou un réticulum branché. Récemment, le groupe de Bach (Bach et al., 2003) a montré que la mitofusine 2 (Mfn2), une protéine de la membrane mitochondriale participant à la fusion mitochondriale dans les cellules de mammifères, contribue à la maintenance du réseau mitochondrial. La répression de Mfn2 entraîne non seulement une fragmentation morphologique et fonctionnelle du réseau de mitochondries en des amas indépendants mais encore une réduction de l'oxydation du glucose, du potentiel membranaire mitochondrial, de la respiration cellulaire et de la fuite de protons. Dans l'obésité le niveau d'expression de Mfn2 est diminué s'accompagnant d'une altération du mécanisme de contrôle des mitochondries par Mfn2.

Dans les muscles de sujets humains sains, une augmentation de l'expression des ARNm de protéines impliquées dans la dégradation, fusion et fission des mitochondries a été

observée en parallèle de l'activation par la calcineurine. En revanche, les muscles de patients avec une insuffisance cardiaque, ont montré des facteurs de transcription de la biogenèse et de la dynamique mitochondriales préservés, sans activation par la calcineurine (Garnier et al., 2005).

Cependant, en raison de la colocalisation des mitochondries avec des éléments du cytosquelette dans la plupart des types cellulaires, une fusion excessive des mitochondries peut être empêchée par des contraintes spatiales *in vivo*. Ainsi, parce que la fréquence de fusion est limitée par les moteurs du cytosquelette et les événements de transport amenant les mitochondries à proximité les unes des autres, une fusion excessive pourrait seulement être possible si la motilité mitochondriale est augmentée ou alors si les attachements mitochondries-cytosquelette sont perturbés (Modzy et Shaw., 2003).

Ces phénomènes seraient donc rendus difficiles, dans les cellules musculaires, par la structure hautement organisée en ICEU.

B. Fonction mitochondriale musculaire du sujet transplanté pulmonaire (TP) et réhabilitation

B.1. La transplantation pulmonaire

B.1.1. Histoire de greffes d'organe

L'histoire de la transplantation d'organes est jalonnée d'étapes essentielles, témoignant d'une intense activité de recherche :

Premier préalable : la suture vasculaire.

Les écoles de Vienne et de Lyon avec ULMAN et CARREL seront pionnières des greffes chez l'animal, reins, cœur...

En 1933, le Russe VORONOV publie la première greffe rénale à partir d'un rein de cadavre. L'échec est immédiat. La transplantation rénale va concentrer tous les efforts. Boston et Paris sont les villes phares de la greffe rénale sur donneurs vivants.

En 1952, première greffe rénale à partir d'un donneur vivant par le Pr. J. HAMBURGER à Paris.

Second préalable : l'immunosuppression.

En 1952, DAUSSET publie ses travaux sur le système HLA.

En 1954, la démonstration de l'obligatoire compatibilité est faite : greffe réussie entre deux vrais jumeaux.

En 1956 à Boston puis à Paris, sont effectuées des greffes entre faux jumeaux avec irradiation et corticoïdes. On perçoit bien que l'on ne peut en rester à la greffe entre jumeaux et que l'obstacle de l'incompatibilité biologique doit être franchi. L'immunosuppression apparaît, elle est induite par irradiation totale, 6-MP, corticoïdes, azathioprine, méthotrexate... et à Richmond, HUME réalise la première greffe avec immunosuppression à partir d'un rein de cadavre.

Troisième préalable : la mort cérébrale.

En 1959, l'école neurologique parisienne et en particulier celle de MOLLARET décrivent l'état de mort cérébrale ouvrant ainsi le champ immense du prélèvement à cœur battant. L'idée du don d'organes apparaît.

Quatrième préalable : la conservation des organes.

Outre le froid, les travaux de COLLINS puis de BELZER apportent des solutés de protection des organes prélevés. La greffe rénale est maîtrisée, la greffe hépatique peut se développer et STARZL, à Denver réalise la première en 1963.

En 1963, la greffe pulmonaire tentée pour la première fois par HARDY est un échec.

En 1968, on note cependant le succès très isolé de DEROM à Gand qui obtient une survie de 10 mois chez un jeune mineur silicotique.

Le 3 décembre 1967, bénéficiant des travaux de SHUMWAY à San Francisco, BARNARD, au Cap, étonne le monde par la première greffe de l'organe le plus symbolique : le cœur. Après l'engouement, la déception se prolongera jusqu'en 1980 où, presque seuls, SHUMWAY et CABROL persévèrent.

Le début de la décennie 80 apporte la découverte de la cyclosporine. Ajouté à l'expérience accumulée, cet agent immunosuppresseur déclenchera un considérable développement de la transplantation.

En 1982, la première greffe cardiopulmonaire est réalisée en Europe par CABROL à Paris.

Dans cet élan, REITZ et SHUMWAY mettent au point la greffe cœur-poumons, l'équipe de PATTERSON à Toronto s'illustre dans la greffe pulmonaire.

Ainsi, en 1986, COOPER, réussit la première transplantation bi-pulmonaire à Toronto.

En Angleterre, YACOUB et WALLWORK révèlent d'impressionnantes séries de greffes cardio-pulmonaires et pulmonaires.

B.1.2. La transplantation pulmonaire

C'est certainement la greffe la plus délicate à réaliser. Outre l'extrême technicité de la transplantation, les poumons sont des organes très fragiles. Les transplantations pulmonaires ou cœur-poumons sont rares par rapport à d'autres greffes. Le poumon résiste mal aux conditions de prélèvement et de conservation. Ces interventions difficiles ne sont réalisées que dans quelques centres extrêmement spécialisés.

La greffe peut être justifiée par une maladie des vaisseaux pulmonaires, comme l'hypertension artérielle pulmonaire ou une altération des poumons eux-mêmes, comme les fibroses pulmonaires, [l'emphysème](#) ou la [mucoviscidose](#) (Trulock, 1997). Lorsqu'elles sont évoluées, ces maladies imposent des soins quotidiens extrêmement contraignants et limitent les activités physiques. Elles entraînent un risque très élevé de décès par infection ou défaillance respiratoire. Une transplantation réussie permet de retrouver une vie quasiment normale.

En 2002 en France, 88 personnes ont reçu une greffe de poumon et 20 une greffe coeur-poumons :

- Près d'un tiers des adultes et 19 des 25 enfants qui ont été inscrits cette année-là sur les listes d'attente pour un greffon pulmonaire étaient atteints de mucoviscidose ;
- L'emphysème et les autres bronchopathies chroniques obstructives (BPCO) viennent en seconde position chez l'adulte, suivi des fibroses.

11 % des greffes chez l'enfant et 4,7 % chez l'adulte correspondaient à une nouvelle transplantation. Près de deux tiers des malades greffés étaient des hommes. Près de la moitié (47,7 %) avaient entre 16 et 45 ans et 34,1 % entre 46 et 65 ans. Seul 4 enfants de moins de 16 ans ont été greffés, ce qui souligne les difficultés pour trouver un organe en bon état de taille adaptée.

La greffe de poumons est réalisée généralement à partir d'un donneur en état de mort cérébrale, dont la respiration et la circulation sont maintenues artificiellement jusqu'au prélèvement. Mais, comme pour le foie ou le rein, un parent vivant peut également proposer de donner une partie de ses poumons. Dans ce cas, un seul poumon est prélevé, le poumon restant permettant d'assurer une fonction respiratoire correcte. Ces greffes avec donneur vivant sont exceptionnelles actuellement (1 cas en 2002, aucun en 2003). Dans ces cas, l'intervention peut être programmée. Receveur et donneur sont opérés en même temps, par deux équipes différentes, dans deux salles d'opération voisines.

Dans le cas d'une greffe avec donneur en état de mort cérébrale, prélèvement et greffes sont réalisées par deux équipes différentes en des lieux différents. Habituellement, l'ensemble coeur-poumons est prélevé chirurgicalement chez le donneur, au bloc opératoire. Ensuite, coeur et poumons sont éventuellement séparés pour être proposés à des malades différents. Les organes sont soigneusement examinés pour vérifier l'absence de lésions. Entre 80 et 85 % des poumons ne peuvent être greffés car ils sont le siège d'un oedème ou d'une infection, ce qui explique en partie l'insuffisance de greffons pulmonaires. Donneur et receveur doivent être de même groupe sanguin ou, en cas d'urgence, de groupes sanguins compatibles.

L'intervention dure 6 à 8 heures. Trois types de greffes peuvent être réalisés :

- La greffe bipulmonaire. Dans ce cas l'ensemble des deux poumons, avec leur vascularisation, est prélevé en bloc chez un donneur, et le poumon droit, puis le gauche, sont greffés successivement à la place des poumons du receveur. L'intervention se déroule souvent sous circulation extracorporelle : le sang est dérivé de part et d'autre du coeur, l'oxygénation et la circulation sanguines étant assurées par un oxygénateur et une pompe extracorporelle ;

- La greffe monopulmonaire. Un seul poumon est remplacé, l'autre étant laissé en place. La circulation extracorporelle n'est généralement pas nécessaire ;
- La greffe coeur-poumons. L'ensemble coeur-poumons est greffé. Dans ce cas la circulation extracorporelle est bien sûr indispensable. La préparation du receveur comprend d'abord l'ablation du coeur, puis celle des poumons. Ensuite les poumons sont mis en place dans le thorax et la trachée est suturée à celle du receveur. Le coeur est suturé comme dans le cas d'une transplantation cardiaque.

La transplantation coeur-poumon est indiquée lorsqu'il existe une altération cardiaque associée à l'atteinte pulmonaire ou en cas d'hypertension artérielle pulmonaire. La transplantation monopulmonaire est exclue en cas de suppuration pulmonaire. Dans les autres cas, le choix de l'intervention se discute. La transplantation monopulmonaire est plus simple et permet de greffer deux personnes à partir d'un seul donneur.

Les 88 transplantations pulmonaires réalisées en 2002 comprenaient 54 greffes bipulmonaires, 33 greffes monopulmonaires et la greffe de deux poumons, droit et gauche, chez un enfant à partir de deux donneurs vivants. A ces transplantations pulmonaires s'ajoutent 20 greffes coeur-poumons. La moitié des patients greffés l'ont été avant 16,9 mois pour la greffe cardio-pulmonaire et avant 9,7 mois pour la greffe pulmonaire.

Ces greffes n'ont permis de couvrir que 18,7 % des besoins en greffes cardio-pulmonaires et 29,8 % des besoins en greffes pulmonaires. La pénurie de greffons est évidente et s'accroît puisque le nombre de nouveaux inscrits pour une greffe pulmonaire a augmenté de 24 % en 2002, alors que le nombre de poumons prélevés stagnait. Un greffon pulmonaire a pu être prélevé chez moins d'un donneur sur dix en état de mort cérébrale. La France est ainsi l'un des pays européens où l'activité de transplantation pulmonaire est la plus faible (et cette activité a encore baissé en 2003). Cela se traduit par une mortalité notable parmi les personnes inscrites sur les listes d'attente : 36 des 295 candidats à la greffe pulmonaire (12,2 %) et 19 des 107 candidats à la greffe cardio-pulmonaire (17,8 %).

Les taux de survie chez les personnes opérées depuis 1996 atteignent 65,7 % à un an, 51,7 % à 3 ans et 36,6 % à 5 ans, après une greffe monopulmonaire, 66,3 % à un an, 49,4 % à 3 ans et 40,4 % à 5 ans, après une greffe bipulmonaire, 66 % à un an et 58,6 % à 3 et 5 ans après une greffe coeur-poumons. C'est donc au cours de la première année que le risque de décès est maximal, en raison du risque d'infection et de rejet aigu. La moitié des patients sont encore en vie 42 mois après une greffe monopulmonaire et 38,2 mois après une greffe bipulmonaire. (Chiffres donnés par l'Etablissement français des greffes).

B.1.3. Le handicap physique du Transplanté pulmonaire (TP)

B.1.4. Altérations centrales

L'ensemble des auteurs s'accorde sur une limitation de la capacité aérobie maximale ($VO_2\max$) des TP se situant entre 50 et 65% de la capacité normale de sujets sédentaires appariés. Depuis les années 90, cette observation n'a toujours pas trouvé d'explications définitives (Williams et al., 1992 ; Levy et al., 1993 ; Tirdel et al., 1998 ; Pinet et al., 2004).

Les effets systémiques de l'insuffisance chronique respiratoire avant la transplantation pulmonaire (Agusti et al., 2003 ; Richardson et al., 2004) et les effets potentiels des immunosuppresseurs (Mercier et al., 1995 ; Hokanson et al., 1995), en particulier la cyclosporine A (Sanchez et al., 2000, 2001), sont mis en avant pour expliquer la limitation de la $VO_2\max$ et la diminution de la capacité à l'exercice après greffe pulmonaire.

B.1.5. Altérations périphériques : le muscle squelettique du TP

Les altérations musculaires des insuffisants respiratoires ne semblent pas restaurées après la transplantation pulmonaire. De plus, il faut signaler la participation de l'atrophie et de la fatigue musculaire qui sont des déterminants particulièrement importants dans la mesure de la capacité à l'exercice de ces sujets. En effet, la fatigue musculaire peut entraver la mesure de la $VO_2\max$, du fait que les tests d'effort réalisés sur ergocycle et sur tapis roulant sont des tests qui sollicitent une forte participation de la musculature des jambes. Dans le cas des TP, une douleur, une faiblesse et une fatigue musculaire des membres inférieurs ont été rapportées au cours de tests d'effort ou d'activités physiques quotidiennes (Williams et al., 1992).

B.2. Adaptation de la fonction mitochondriale du muscle squelettique à un programme de réhabilitation physique

B.2.1. Contrôle et adaptation du phénotype musculaire

B.2.1.1. Rappels des modalités du typage histochimique des fibres musculaires

Dès la deuxième moitié du XIX^{ème} siècle, Ranvier, évoqua l'hétérogénéité du tissu musculaire en distinguant des muscles blancs et des muscles rouges. Ce n'est que vers la fin des années 50 qu'une méthode objective de typage des fibres musculaires fut proposée, basée sur une analyse histochimique de l'activité enzymatique de l'ATPase de la myosine (Pette et Staron., 1990). Cette méthode permettait de caractériser les fibres musculaires en fibres de

type I (faible activité ATPasique) et en fibres de type II (activité ATPasique élevée). Le typage des fibres se fait classiquement par différentes méthodes histochimiques en mettant en évidence la sensibilité au pH de la myosine ATPase caractérisant la contractilité (lente ou rapide), l'activité de la succinate déshydrogénase (SDH) qui est une enzyme du métabolisme oxydatif. La biologie moléculaire permet aussi de caractériser et d'identifier les différents types de myosines spécifiques à chaque fibre musculaire.

Plus tard, les propriétés physico-chimiques de l'ATPase, et sa sensibilité à différents pH fut exploitée pour proposer une classification histochimique qui permet de prendre en considération 2 sous-types de fibres rapides, IIa et IIb, et une catégorie de fibres IIc prenant une coloration intermédiaire entre les grands sous-groupes (Brooke et Kaiser., 1970). De nombreuses modifications et ajustements ont été proposés, permettant non seulement de définir différents sous-groupes de fibres rapides (Staron et Pette., 1986), mais aussi de souligner l'extrême sensibilité de cette méthode de typage.

Le typage des fibres a longtemps été effectué par marquage histochimique de l'activité myosine ATPase (Brooke et Kaiser, 1970). La détermination du type de fibre par électrophorèse des MHC sur fibres isolées (Pette et Staron., 1990) a montré l'existence de 3 types principaux de MHC rapides [types IIA, IIB, et un nouveau type IID ou IIX (un type intermédiaire)] et d'un type de MHC lent qui possède aussi les types de MHC IIA, MHC IIB, MHC IID ou IIX et MHC I. Ces isoformes de MHC sont des protéines non pas issues d'une régulation post-transcriptionnelle d'autres MHC, mais dérivent de gènes différents (Schiaffino et Reggiani, 1994). L'apparition de fibres hybrides comportant pour certaines plus de 2 isoformes de MHC, a contribué à la combinaison du marquage de la myosine ATPase et de l'électrophorèse des MHC pour le typage (Gorza, 1990). Enfin, l'hybridation *in situ* (Kanbara *et al.*, 1997) et la RT-PCR sur fibres isolées (Peucker *et al.*, 1998) ont permis non seulement de valider les méthodes précitées, mais aussi de préciser l'appartenance d'isoformes spécifiques à un type de fibre déterminé.

Il existe une bonne corrélation entre le typage des fibres par la technique de la myosine ATPase et le type d'isoforme de la myosine et il est admis que le typage histochimique est un bon reflet de la composition du muscle en myosine (Staron et Pette., 1986).

B.2.1.2. Notion de phénotype musculaire

Chaque type musculaire présente des caractéristiques fonctionnelles, structurelles, biochimiques et métaboliques qui lui sont propres et qui définissent son phénotype. Par ailleurs, les différentes familles de protéines qui entrent dans la constitution de la fibre

musculaire peuvent être schématiquement subdivisées en protéines contractiles et en protéines enzymatiques sarcoplasmiques ou mitochondriales. On peut ainsi définir un phénotype contractile et un phénotype métabolique qui représentent les 2 grandes caractéristiques du muscle, complémentaires l'une de l'autre, mais qui ne sont pas toujours co-régulées.

B.2.2. Modifications induites sur le phénotype musculaire par l'entraînement

B.2.2.1. Les facteurs limitant la consommation maximale d'oxygène ($VO_2\text{max}$)

Le passage de l'oxygène atmosphérique des poumons à la mitochondrie comporte une série d'étapes au niveau desquelles une entrave au flux d'oxygène peut avoir lieu. La consommation maximale d'oxygène de l'organisme ($VO_2\text{max}$) est déterminée par plusieurs facteurs physiologiques : la capacité de diffusion pulmonaire, la débit cardiaque maximal, la capacité du sang à transporter l' O_2 , la capillarisation et les capacités oxydatives du muscle. Les trois premiers facteurs peuvent être regroupés comme facteurs centraux, alors que le quatrième est un facteur périphérique.

B.2.2.2. Les facteurs centraux

- Le système pulmonaire

Pour la plupart des individus réalisant un exercice exhaustif au niveau de la mer, les capacités pulmonaires sont suffisantes et même excessives, pour maintenir la saturation du sang artériel en O_2 supérieure à 95% (Weibel et al., 1991). Seuls les athlètes d'élites en endurance ont montré une désaturation en O_2 durant un exercice maximal (Dempsey et al., 1984). Ces athlètes ayant un débit cardiaque extrêmement important, le temps de transit des globules rouges diminue fortement dans les capillaires pulmonaires et par conséquent, la durée pendant laquelle le sang se trouve dans les capillaires pulmonaires est insuffisante pour le restaurer entièrement en O_2 .

- Le débit cardiaque maximum

Les travaux de Hill ont montré qu'il existe une relation linéaire entre le débit cardiaque maximum et la $VO_2\text{max}$ des sujets (Hill et Lupton., 1923). L'adaptation du débit cardiaque aux variations de $VO_2\text{max}$ que l'on peut observer entre un sujet sédentaire et un sujet de même âge entraîné en endurance est principalement due aux variations du volume d'éjection systolique maximal, plutôt qu'aux variations de la fréquence cardiaque maximale et de l'extraction maximale de l'oxygène. La quantité d'oxygène contenue dans le sang artériel est d'environ 200 ml d' $O_2.L^{-1}$. Dans le sang veineux quittant les muscles actifs, la quantité d' O_2 n'est plus que de 20 ml d' $O_2.L^{-1}$. Ainsi, au maximum de l'exercice, quasiment tout

l'oxygène disponible est extrait du sang qui perfuse les muscles actifs. Le mécanisme permettant d'augmenter la $VO_2\text{max}$ suite à un entraînement découle d'une augmentation du débit cardiaque et donc de l'apport en oxygène au muscle. Il a été estimé que 70-85% de la limitation de la $VO_2\text{max}$ est liée au débit cardiaque maximum (Bassett et Howley., 2000).

- La capacité du sang à transporter l' O_2

Au repos, la concentration en hémoglobine (Hb) des athlètes en endurance se situe au niveau des valeurs trouvées chez les sédentaires. Par ailleurs, cette Hb ne change pas après entraînement et n'est pas corrélée avec la $VO_2\text{max}$. La question qui se pose est de savoir si une augmentation d'Hb lors d'un exercice exhaustif pourrait provoquer une augmentation de la $VO_2\text{max}$. Des études de réinjection de globules rouges (1000-2000 ml de sang) et d'administration d'érythropoïétine ont permis de répondre à cette question en démontrant que la $VO_2\text{max}$ et le temps de maintien avant épuisement, durant un exercice maximal augmentent (Ekblom, 2000). D'autre part, pour un exercice sous maximal, la VO_2 reste inchangée, avec un seuil ventilatoire inchangé ou faiblement augmenté, alors que la fréquence cardiaque et la concentration en lactate sont réduites. Ces expériences démontrent ainsi que l'augmentation de l'apport en O_2 par une augmentation des capacités de transport de l'oxygène permet d'améliorer la $VO_2\text{max}$.

B.2.2.3. Les facteurs périphériques

- La densité capillaire

La microcirculation, les capillaires en particulier, jouent un rôle capital dans la délivrance de l' O_2 aux fibres musculaires. Dans le muscle squelettique, les capillaires se situent le long de l'axe longitudinal des fibres musculaires et l'importance de leur sinuosité ainsi que le grand nombre d'embranchements contribuent à leur grande longueur totale. Le degré de sinuosité varie en fonction de la longueur des sarcomères et s'avère un déterminant important de la surface totale du capillaire. Plus précisément il a été montré que la taille de la jonction du capillaire à la fibre est de première importance lorsqu'on considère la capacité structurale du flux en oxygène (Mathieu-Costello et al., 1992). Le nombre de capillaires par fibre musculaire est couplé au profil métabolique et à la taille de la fibre. Plus la fibre a un métabolisme oxydatif important et plus sa densité capillaire est grande (Degens et al., 1992). L'entraînement en endurance permet d'augmenter la densité capillaire musculaire (Andersen et Henriksson., 1977) par une augmentation du nombre du capillaire plutôt que par une augmentation de leur degré de sinuosité (Mathieu-Costello et al., 1992). Dans le vaste externe, une forte corrélation entre le nombre de capillaires par fibre et la $VO_2\text{max}$ a également été

mise en évidence (Saltin et al., 1977). La nécessité du développement du réseau capillaire ne réside pas seulement dans l'adaptation des réseaux capillaires par rapport au flux sanguin mais dans le maintien ou même l'augmentation du temps de transit entre le sang et le muscle actif, ce qui permet l'extraction de l'O₂ malgré des débits sanguins accrus.

- Les gradients de diffusion périphériques de l'oxygène

Le passage de l'O₂ entre le globule rouge et le sarcolemme représente le principal site de résistance à la diffusion de l'O₂, du fait de la chute importante de la pO₂. Honig et ses collaborateurs (Honig et al., 1992) ont démontré que ce n'est pas la délivrance de l'O₂ en elle-même qui est directement limitante, mais c'est une faible pO₂ sanguine qui est nécessaire pour maintenir une force de diffusion importante et d'accroître ainsi la conductance de l'O₂. La diffusion de l'oxygène dépend donc de l'interaction entre le transport de l'O₂ par la myoglobine et sa consommation par la mitochondrie.

- Les capacités oxydatives musculaires

Des études chez l'Homme ont montré, après un entraînement en endurance bien calibré, que la VO₂max n'augmentait que de 10-20% tandis que les activités des enzymes oxydatives augmentaient de plus de 200% (Saltin et al., 1977). Il a donc été proposé que l'augmentation des capacités oxydatives permette l'augmentation de la performance en endurance plutôt que l'amélioration de la VO₂max. Ainsi, pour un exercice sous maximal, l'augmentation des capacités oxydatives observée dans les muscles entraînés induirait de plus faibles perturbations du métabolisme cellulaire. L'augmentation de leur nombre éviterait aux mitochondries de fonctionner au maximum de leurs possibilités et permettrait une meilleure extraction de l'O₂ à partir du sang artériel, contribuant, de façon mineure, à l'augmentation de la VO₂max. D'autre part, l'augmentation des capacités oxydatives jouerait un rôle permissif pour l'augmentation de la VO₂max.

B.2.3. Modifications du phénotype musculaire après l'entraînement

B.2.3.1. Effets sur le phénotype contractile

Les effets de l'exercice en endurance, comme la course à pied, sur le profil des chaînes lourdes de myosine ou MHC : myosin heavy chain) apparaissent être muscle-spécifiques et travail-dépendants. Par exemple chez le petit rongeur, lorsque les animaux sont entraînés à courir à une intensité élevée (30m/min, 20% d'inclinaison, 75% VO₂max) pendant plusieurs semaines, la proportion des MHC IIa et IIc est augmentée alors que la proportion des MHC IIb est significativement diminuée dans le muscle gastrocnémien. A l'opposé, on note une

augmentation de l'expression des MHC I uniquement si la durée d'exercice quotidien est augmentée de façon drastique (Demirel et al., 1999). Chez les marathoniens et les athlètes en endurance, la proportion des MHC I atteint 80-90% des MHC totales, les 10-20% restant se composant de MHC IIa (Andersen et al., 2000). D'un autre côté, l'entraînement en endurance à haute intensité sur une courte période, induit une transition des MHC rapides vers les MHC lentes dans le muscle vaste externe (Schaub et al., 1989). Ainsi, l'expression des MHC peut être modifiée via l'augmentation chronique de l'activité contractile comme lors de l'entraînement en endurance. Tonkonogi et ses collaborateurs ont mis en évidence une corrélation dans le muscle vaste externe entre le pourcentage de MHC I et la $VO_2\text{max}$, démontrant l'importance du profil en MHC dans les capacités à l'exercice des sujets (Tonkonogi et al., 1998). D'un autre côté, même s'il semble qu'il y ait une relation positive entre le pourcentage de fibres I et le rendement énergétique musculaire chez les sportifs de haut niveau (Coyle, 1992), la différence d'efficacité entre les fibres de type I et II chez l'Homme, semble relativement faible. Les différences de performance entre différents sujets ne peuvent pas s'expliquer uniquement par une différence dans la distribution des types de fibres (Mallory et al., 2002). En effet, il a été montré que lors d'un exercice sous maximal, il n'y a aucune relation entre les paramètres de « l'économie musculaire » ($\Delta VO_2/\Delta$ puissance mécanique) ou de « l'efficacité musculaire » (Δ énergie totale consommée/ Δ puissance mécanique) et le pourcentage de fibres de type I (Mallory et al., 2002).

B.2.3.2. Effets sur le phénotype métabolique

L'entraînement en endurance permet de mettre en place une séquence de processus adaptatifs par lesquels le muscle squelettique acquiert des caractéristiques structurales, physiologiques et biochimiques lui permettant de produire en aérobose une puissance mécanique soutenue plus importante, tout en retardant l'apparition de la fatigue ou de la douleur. Ainsi, l'entraînement en endurance active la biogenèse mitochondriale dans le muscle. Cette biogenèse mitochondriale est une conséquence des changements métaboliques musculaires se produisant au cours de l'exercice. En effet, durant la contraction musculaire, l'élévation de la [ADP] favorise la réaction catalysée par la créatine kinase vers la formation de créatine et d'ATP. Il a été démontré qu'après entraînement en endurance, une plus faible augmentation de l'ADP était nécessaire pour atteindre le même niveau de consommation d'oxygène (Dudley et al., 1982 ; Constable et al., 1987). L'ADP étant un activateur allostérique de la glycolyse anaérobie, celle-ci ne va donc être que faiblement activée, diminuant la production d'acide lactique. De plus, l'acide lactique formé est plus efficacement

éliminé après un entraînement en endurance. Plus la densité mitochondriale sera importante et moins la glycolyse anaérobie est sollicitée (Hood, 2001). Ces adaptations aboutissent donc à un changement conséquent du métabolisme énergétique, avec comme principale conséquence l'amélioration de la résistance à la fatigue.

L'utilisation de la technique des fibres perméabilisées à la saponine n'a été que récemment employée chez l'Homme. Elle a permis de montrer que la sensibilité mitochondriale à l'ADP est plus faible d'une part lorsque le pourcentage de fibres de type I est plus élevé dans le muscle et d'autre part, suite à un entraînement (Tonkonogi et al., 1998 ; Walsh et al, 2001). Récemment Zoll et ses collaborateurs ont montré une diminution de l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP et une augmentation du rôle fonctionnel de la créatine kinase mitochondriale, démontrant ainsi une adaptation fonctionnelle de la mitochondrie à la fois dans les fibres glycolytiques et oxydatives (Zoll et al., 2003a,b), chez des rats effectuant une activité physique volontaire. Ces changements métaboliques se font indépendamment du phénotype contractile. D'autre part, des résultats similaires ont été obtenus chez des sujets ayant différents niveaux d'activité physique (Zoll et al., 2002). Cette étude a mis en évidence que la créatine kinase mitochondriale devient fonctionnellement couplée à la production d'ATP uniquement chez les sujets sportifs qui sont capables de soutenir une activité physique importante et prolongée. Ceci suggère que chez ces sujets les capacités oxydatives ne dépendent pas seulement de la quantité de mitochondries, mais également des mécanismes de contrôle de la respiration mitochondriale.

OBJECTIFS SCIENTIFIQUES

Les données disponibles dans la littérature montrent que la fonction mitochondriale est régulée différemment *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, l'affinité du système respiratoire mitochondrial pour l'ADP exogène est élevée (K_m apparent 10-20 μM). *In situ*, le K_m apparent est de 300-400 μM et ce paramètre est contrôlé par des structures cellulaires restant encore à déterminer.

Comme cette introduction a tenté de le montrer, il existe de nombreuses et complexes interactions entre les mitochondries et leur environnement cytoplasmique. Cela fournit donc des voies de recherche diverses quant à la nature des candidats possibles pour la régulation de la fonction mitochondriale *in vivo*.

D'après notre hypothèse d'organisation structurale et fonctionnelle des cellules musculaires en ICEUs, les mitochondries sont organisées de manière très ordonnée. A ce jour, les seules informations concernant l'arrangement intracellulaire des mitochondries reposent sur des observations de microscopie électronique (Ogata et Yamasaki., 1985, 1997). C'est la raison pour laquelle nous avons essayé d'aborder cette problématique à l'aide d'une approche nouvelle, à la fois qualitative et quantitative, dans les différents types de cellules musculaires striées. Cette méthode d'analyse repose sur une modélisation de la distribution des mitochondries observée en microscopie confocale.

➤ ***Etude de l'organisation intracellulaire des mitochondries par imagerie confocale : approche qualitative et quantitative.***

De plus, les différences de K_m apparent pour l'ADP exogène observées en oxygraphie entre mitochondries isolées et *in situ*, reflètent l'existence de facteurs dans l'environnement des mitochondries capables de réguler la sensibilité de la mitochondrie pour l'ADP. Ceci pourrait s'effectuer à 2 niveaux : au niveau de VDAC sur la membrane externe mitochondriale mais également autour de la mitochondrie par des barrières de restriction de diffusion de l'ADP. Ainsi, l'organisation structurale des mitochondries en complexes fonctionnels avec les myofibrilles et le réticulum sarcoplasmique (ICEUs), pourrait être à la base d'un modèle d'organisation du métabolisme énergétique dans les cellules musculaires oxydatives et pourrait conduire à une diffusion hétérogène de l'ADP dans ces cellules. C'est

ce que nous nous proposons de vérifier dans une deuxième partie de ce travail en alliant expérimentations biologiques et modélisation mathématique (modèle du Dr M. Vendelin).

- *Etude in situ et in silico de l'hétérogénéité de diffusion de l'ADP et de la respiration mitochondriale dans les cellules perméabilisées.*

La valeur élevée du Km apparent pour l'ADP exogène mais aussi la compartimentation des nucléotides adényliques, la canalisation métabolique et enfin un couplage fonctionnel ANT-MiCK sont caractéristiques des cellules musculaires oxydatives dont la structure est formée d'une succession d'ICEUs. Il est important de connaître quelles sont les conséquences des restrictions de diffusion de l'ADP dans les cellules musculaires sur ces aspects du métabolisme énergétique mais surtout quels mécanismes sont mis en jeu pour assurer la stabilité métabolique et la régulation de la phosphorylation oxydative dans les cellules musculaires oxydatives.

C'est ce que nous nous proposons de déterminer dans la troisième partie de ce mémoire.

- *Etude de la régulation de la fonction mitochondriale et de la stabilité métabolique : analyse du couplage fonctionnel ANT-MiCK*

Par ailleurs, l'organisation hautement précise des mitochondries au sein des ICEUs est très vraisemblablement liée aux éléments du cytosquelette comme l'ont montré de nombreuses études citées dans l'introduction de ce mémoire.

La quatrième partie de ce travail de thèse s'est intéressée plus précisément à la tubuline, et au réseau microtubulaire dans les différents types de cellules musculaires striées (cœur, muscle oxydatif et glycolytique). Ainsi une étude structurale mais également fonctionnelle a été menée pour déterminer si la tubuline, ou les microtubules, participe(nt) à l'organisation intracellulaire des mitochondries et à la régulation de la phosphorylation oxydative *in situ*. L'utilisation d'animaux transgéniques déficients en protéine STOP, a permis pour la première fois d'étudier cette microtubule-associated protein dans les différents types de cellules musculaires.

- *Etude du rôle potentiel de la tubuline, du réseau microtubulaire et de la protéine STOP dans l'organisation intracellulaire des mitochondries et dans la régulation de la fonction mitochondriale dans les cellules musculaires striées.*

Enfin, la dernière partie de ces travaux a été consacrée à une recherche clinique. En effet, nous nous sommes intéressés à l'étude des modifications de la respiration mitochondriale de muscle squelettique chez des transplantés pulmonaires et aux effets d'un réentraînement de ces sujets en regard d'un groupe témoin. Cette étude originale a pour but de comprendre les mécanismes cellulaires à l'origine du dysfonctionnement musculaire persistant après transplantation pulmonaire d'une part, et les bénéfices d'une réhabilitation à domicile d'autre part. Cette étude s'apparente à une application de notre théorie d'ICEU dans laquelle nous allons déterminer les caractéristiques de la fonction mitochondriale de muscle squelettique.

- *Etude des modifications de la respiration mitochondriale de muscle squelettique chez des transplantés pulmonaires avant et après réhabilitation.*

MATERIEL et METHODES

A. Description des expérimentations

1. Animaux

Les expérimentations animales ont été effectuées conformément au « Guide for the Care and Use of Laboratory Animals » publié par le National Institute of Health (NIH Publication No 85-23, révisé en 1985).

Rats Wistar

Des rats de souche Wistar mâles et femelles de 250-400 g ont été utilisés dans les expériences. Ils proviennent soit de la reproduction au sein de l'animalerie soit d'une source commerciale. Les animaux sont gardés par cage de 5 maximum à température constante ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) avec des cycles alternant 12h de jour et de nuit. Les animaux ont été nourris avec de la nourriture standard de laboratoire.

Souris sauvages et transgéniques STOP K/O

Ces souris ont été gracieusement données par le CEA, Grenoble, France.

Une souche de souris STOP obtenue par recombinaison homologue, développée au CEA. Ces souris STOP +/+ et STOP -/- sont les souris de la génération issue des croisements entre les premiers hétérozygotes (50% 129SvPas et 50% BALBc) pour la mutation STOP. Cette mutation consiste en l'invalidation du gène STOP par élimination de l'exon I. Les souris STOP-/- n'expriment plus aucune isoforme de STOP. Les souris BALBc et 129SvPas proviennent des Laboratoires Charles River.

2. Technique des fibres perméabilisées

La technique des fibres perméabilisées a été décrite pour la 1^{ère} fois par Endo et Kitazawa en 1978. Elle a ensuite été introduite au Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale & Appliquée par le Pr V.A. Saks en 1993.

Préparation des fibres :

Un rat femelle Wistar de 200-250 g est anesthésié au pentobarbital sodique (50mg/ml). Toutes les étapes se déroulent à 4°C dans la solution A (de conservation). Le cœur est prélevé et débarrassé des oreillettes et de l'aorte. Il est ensuite ouvert le long du ventricule gauche et des fragments tissulaires sont prélevés (lambeaux de 5-7 mm de longueur et 0,3- 0,5 mm de large).

Les fibres obtenues sont dilacérées mécaniquement à l'aide de fines aiguilles. L'étape de dilacération sert à l'oxygénation du tissu et permet une meilleure accessibilité au détergent de perméabilisation.

La saponine (50 µg/ml) est utilisée pour la perméabilisation pendant 30 min, à 4°C, sous agitation, dans la solution A. Les fibres subissent ensuite 3 lavages successifs de 10 min, à 4°C, sous agitation, dans la solution B(M) (solution de respiration). Ces lavages ont pour but d'éliminer l'ADP présent dans le milieu après la perméabilisation.

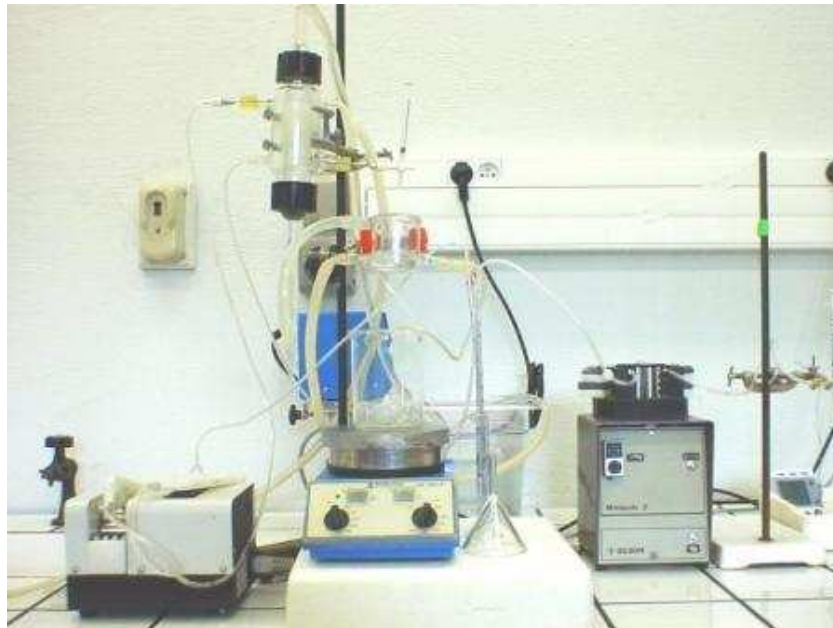
La saponine a été choisie comme détergent car elle possède une très forte affinité de liaison avec le cholestérol retrouvé dans la membrane du sarcolemme. La membrane externe mitochondriale ne contenant pas de cholestérol (voire très peu), la perméabilisation est donc sélective et ne remet pas en cause l'intégrité des mitochondries. Ce système permet ainsi d'étudier les mitochondries au sein de la cellule avec une structure environnante intacte c'est à dire "*in situ*".

3. Isolement des cardiomyocytes

Mode opératoire d'après la technique du Lab. de Cardiologie Cellulaire et Moléculaire INSERM U446 – Chatenay Malabry

Un rat mâle Wistar de 300 g est anesthésié au pentobarbital sodique (50mg/ml). Le cœur est prélevé puis mis dans une coupelle avec de la solution stock réfrigérée. Puis le cœur est canulé par l'aorte et perfusé avec de la solution stock à 37°C et bullée avec un débit de 6 ml/min (environ) pendant 4 minutes. On perfuse ensuite pendant 50 minutes à 4ml/min avec de la solution B, $[Ca^{2+}] = 20-25 \mu M$ (voir l'état de digestion du cœur, ce temps peut être augmenté). Le cœur est récupéré dans une coupelle contenant de la solution C $[Ca^{2+}] = 20-25 \mu M$.

Fig. 31. Photographie du dispositif de perfusion



La suite du protocole se déroule en salle de culture :

Le cœur est coupé (ou dilacéré selon l'état de digestion du cœur), les ventricules sont émincés en morceaux très petits. Les cellules sont filtrées à travers un filtre en voile nylon.

1^{ère} décantation

On laisse décanter 5 minutes. Le surnageant est éliminé. On reprend les culots dans exactement 10 ml de solution C. On place les 10 ml de suspension dans un flacon de 25 ml au bain-marie.

Faire un gradient de Ca^{2+} :

Après 5 min ajouter du CaCl₂ [Ca²⁺] libre : 70- 75 μM

Après 10 min ajouter du CaCl₂ [Ca²⁺] libre : 320- 325 μM

On verse les 10 ml de suspension dans un tube de 50 ml et laisser 5 min.

2ème décantation

On aspire le surnageant et on reprend le culot dans 10 ml de solution D et on laisse 5 min.

3ème décantation

On aspire le surnageant et on reprend le culot dans de la solution D.

On laisse sédimenter à 37°C pendant 15 min. On enlève le surnageant.

On resuspend dans la solution MitoMed, ces dernières étant prêtes à l'utilisation.

Les résultats de ce travail présentent des cardiomyocytes préparés par Joëlle Demaison et Serge Soyez (protocole décrit ci-dessus) ainsi que des cellules préparées par le Dr. José Olivares, du LBFA, selon la technique décrite dans l'article de Kay et al (Kay et al., 1997).

4. Isolement des mitochondries de cœur

Il consiste après découpage et broyage des tissus en une succession de centrifugations différentielles.

Le culot mitochondrial final est remis en suspension pour obtenir une concentration protéique de l'ordre de 12 mg/ml.

Technique de fractionnement par centrifugation différentielle + Trypsine :

Trois rats femelles Wistar de 200-250 g sont anesthésiés au pentobarbital sodique (50mg/ml). Toutes les étapes se déroulent à 4°C dans une solution sucrose (240 mOsm). Les cœurs sont prélevés, vidés de leur sang et débarrassés de l'aorte. Les cœurs sont découpés à l'aide de ciseaux dans une coupelle sur la glace ou à 4°C sans solution, puis les morceaux sont introduits dans le Potter I afin d'être homogénéisés (grossièrement) en présence de 3 mg de trypsine dans 15 ml de tampon ([trypsine]= 0,125 mg/ml). La vitesse de rotation est de 200 lors des deux passages. On laisse agir la trypsine 15-20 min à 4°C.

La réaction est stoppée par l'inhibiteur de la protéase à une concentration de 0.5 mg/ml, soit 10 mg dans 15 ml ajoutés directement au 15 ml déjà présents.

Vitesse de rotation 250 (2 passages), puis avec le Potter II 3 passages à 300 (et 1 à 200 si pas totalement homogène).

L'homogénat est centrifugé 10 min à 700g à 4°C, le surnageant est ensuite centrifugé 20 min. à 6000g, le culot (Mito) est remis en suspension dans le tampon sucrose (environ 15 ml) suivi d'une homogénéisation manuelle avec le Potter III, et nouveau centrifuger 15 min. à 6000g. Enfin le culot est prélevé, la fraction légère de mitochondries (couche blanche) est éliminée par une légère agitation manuelle, puis le culot est remis en suspension dans le tampon 1ml + 1ml (ou 500µl+500µl, tout dépend de la concentration finale voulue) à 4°C, enfin homogénéisation manuelle avec le Potter IV.

5. Extraits musculaires de rat

Ces extraits sont préparés pour faire des western blots (différentes isoformes de tubuline et protéine STOP).

Un rat Wistar est anesthésié au pentobarbital sodique (50 mg/ml). Le cœur ainsi que le soléaire et le vaste externe sont rapidement prélevés et immergés dans des béciers contenant du tampon PEM. Toutes les étapes se déroulent à 4°C dans le tampon PEM. Le cœur est vidé de son sang et débarrassé de l'aorte et des oreillettes. Les différents muscles sont ensuite broyés manuellement à 4°C, dans un Potter en verre de 2cm³ (Potter IV) contenant un minimum de tampon PEM. La dilution généralement utilisée est 1/20 soit 50 mg de tissu frais dans 1 ml de tampon. Ceci aboutit à une concentration finale en protéine de 10 mg/ml. Une fois broyés, les muscles sont mis à bouillir dans 15 min à 100°C puis subissent très rapidement une ultra-centrifugation de 70000 rpm pendant 30 min à 4°C. Les surnageants sont récupérés en fin de centrifugation. Une grande partie des surnageants est stockée à -80°C. Un échantillon de surnageant est dilué avec du bleu de coloration (NuPage™ LDS Sample buffer (4X), Invitrogen, France), dilution 1/4, pour être déposé sur gel. Les western blots ont ensuite été réalisés au CEA, Grenoble par Annie Andrieux et Dominique Proietto.

6. Sujets humains

Critères d'inclusion

- *Pour tous les participants*, compte tenu du caractère d'étude sans bénéfice individuel direct, un examen médical sera réalisé avant l'expression du consentement des patients. Les résultats de cet examen seront remis au médecin de leur choix. Tous doivent être affiliés ou bénéficiaires d'un régime de la sécurité sociale. La participation éventuelle à cette étude est volontaire, et une compensation financière peut être versée compte tenu des contraintes et du temps passé à faire ces explorations (article L. 1124-2). Tous les participants seront inscrits sur le fichier national des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales sans bénéfice individuel direct et auront la possibilité de vérifier auprès du Ministère chargé de la Santé de l'exactitude des données vous concernant présentes dans le fichier et de leur destruction au terme du délai d'un an prévu à l'article R. 2045 du CSP.

Critères de non inclusion

- Conformément au Code de la Santé Publique (articles L. 1121-4, L. 1121-5, L. 1121-6), ne peuvent pas participer à cette étude les femmes enceintes, parturientes et mères qui allaitent, une personne privée de liberté par décision judiciaire ou administrative, en situation d'urgence, une personne hospitalisée sans consentement, mineur, majeur protégé par la loi, ou admise dans une structure de soin ou sociale pour un motif autre que la recherche, ou encore non affilié ou bénéficiaire d'un régime de la sécurité sociale. On ne peut participer qu'à une seule recherche sans bénéfice individuel direct en même temps et ce jusqu'à 3 mois suivant la fin de cette étude.
- Incapacité à signer un consentement éclairé.
- Non-signature du consentement éclairé.
- Réhabilitation réalisée moins de 6 mois avant l'inclusion.
- Non-stabilité depuis moins de 3 mois.
 - Rejet aigu et / ou infection active chez le transplanté thoracique.

6.1. Témoins

Ils seront recrutés au sein des équipes investigatrices après signature d'un consentement éclairé en veillant à un bon appariement en terme d'âge et de sexe des patients inclus. Ils sont indemnes de pathologie cardio-respiratoire et ne reçoivent pas de thérapeutiques susceptibles

de modifier la respiration mitochondriale. Ils ont une activité physique de moins de 3 heures programmées par semaine. Douze sujets contrôle seront inclus après lecture d'une information spécifique aux sujets témoins et signature du consentement éclairé spécifique aux sujets témoins.

6.2. Sujets transplantés pulmonaires (TP)

L'ensemble des transplantés pulmonaires peut participer sous réserve que la transplantation date de plus de 3 mois et que les patients puissent participer à une réhabilitation respiratoire. En pratique, il convient que les patients soient indemnes de rejet aigu et d'infection active. En cas de survenue de telles complications, la réhabilitation est suspendue jusqu'au contrôle de ces complications intercurrentes. L'existence d'un rejet chronique n'est pas en soi une contre-indication à l'inclusion. Douze patients seront inclus après signature du consentement éclairé.

7. Protocole clinique

7.1. La biopsie musculaire à la pince chez l'Homme

Description et usage

Historiquement, la technique de biopsie musculaire à l'aiguille a été décrite en 1868 par Duchenne. Cette technique a été reprise et développée dans la communauté scientifique scandinave chez le sujet sain. La biopsie est réalisée à l'aide d'un trocard mis au point en 1962 par Bergström. Les prélèvements musculaires sont pratiqués principalement au niveau de 4 muscles : vaste externe, deltoïde, soléaire et gastrocnémien. Le trocard utilisé par Bergström a été remplacé par la pince de Weil Blakesley en référence à l'étude de Henriksson (Henriksson, 1979), ce qui permet de prélever un fragment moyen de 100 mg de tissu musculaire. Une anesthésie locale de la peau et de l'aponévrose est réalisée quelques minutes avant la biopsie. Les analyses faites au laboratoire sur ce fragment tissulaire sont citées ci-après.

Pratique de cette technique dans le monde

Un bilan a été présenté par Bergström (Bergström, 1975) portant sur 5000 biopsies pratiquées dans de multiples circonstances de repos et d'exercices. Il est possible de réaliser ces biopsies avant ou dès l'arrêt d'exercices de toute nature. Sur l'ensemble des 5000 biopsies, Bergström rapporte un seul incident de lésion artérielle nécessitant une intervention chirurgicale et quelques hématomes intramusculaires qui se sont résorbés spontanément. Une large revue des résultats obtenus à partir de ces biopsies a été présentée par Saltin et al. (1977 et 1983). Elle montre à cette dernière date (1983) une utilisation courante de cette technique dans la communauté scientifique anglo-saxonne et scandinave.

Une biopsie à la pince est réalisée sous anesthésie locale conformément aux études récentes (Maltais et al., 1996 ; Bussières et al., 1997 ; Lampert et al., 1998 ; Pouw et al., 1998). Les sujets ne doivent pas avoir fait d'efforts significatifs dans les 24 heures précédentes. La biopsie musculaire sera réalisée dans le muscle vaste externe :

- Localisation : face antéro-externe de la cuisse, jonction 1/3 inférieur - 1/3 moyen du segment joignant l'interligne fémoro-tibial et l'épine iliaque antéro-supérieure ;
- Rasage large et dégraissage (éther) nettoyage (alcool et Bétadine) ;
- Anesthésie locale (Xylocaïne 2%) de la peau et de l'aponévrose musculaire ;

- Incision cutanée et aponévrotique sur une longueur de 6 à 10 mm ;
- Introduction d'une pince de Weil-Blakesley de petite taille (3,5 mm de diamètre) à une profondeur de 1 cm dans le muscle ;
- Ouverture de la pince, section et extraction du tissu ;
- Compression au poing d'une durée de 5 minutes dès l'extirpation de la pince ;
- Fermeture par bandes adhésives maintenues en place pendant 5 jours ;

La quantité moyenne de tissu obtenu par cette technique est de **100 mg**. Cette biopsie est répartie en 3 fragments sur une plaque stérile dépourvue d'ARNases :

- 20 mg pour l'analyse ultra structurale, immédiatement congelé dans l'azote liquide via son immersion 10 secondes dans un récipient rempli d'isopentane, lui même plongé dans l'azote liquide. Le fragment est ensuite placé dans un tube Eppendorf pour analyse ultérieure.
- 40 mg pour l'étude de l'expression des gènes par le micro array spécifique du muscle squelettique. Ce fragment est préservé dans un milieu ARNase free. Une extraction secondaire de l'ARN est faite puis cet ARN est réparti sur le micro-array.
- 40 mg pour l'analyse oxygraphique. Une fois prélevés, les fragments musculaires sont conservés dans une solution A dite solution de conservation, contenant en particulier: ATP + PCr à 4°C. Les fibres sont ensuite dilacérées à l'aide de pinces chirurgicales sous une loupe binoculaire, afin de permettre une meilleure action du détergent. Puis, elles sont placées dans la solution A contenant de la saponine à une concentration de 50 µg/mL. Cette étape de perméabilisation se déroule à 4°C, pendant 30 min. et sous une agitation constante et modérée. Les fibres ainsi perméabilisées sont lavées deux fois 10 minutes dans une solution B ou solution de respiration, sans composés phosphorylés toujours à 4°C et sous agitation. Ces lavages permettent l'élimination de la saponine, de la phosphocréatine et des nucléotides adényliques contenus dans la solution de conservation. Ce détergent se combine au cholestérol rendant les sarcolemmes perméables à l'ADP. L'ajout de ce dernier au cours des expériences réalisées permet de déterminer les variables cinétiques (V_{max} = vitesse maximale de consommation d'oxygène et K_m apparent pour l'ADP) sur les tracés obtenus par l'oxygraphe. Cette technique possède de nombreux avantages, elle est économique et simple à réaliser. En effet, elle permet de conserver le milieu intracellulaire et donc de faire une étude de la fonction mitochondriale «*in situ*». Elle évite également d'endommager les membranes des mitochondries (quasiment

dépourvues de cholestérol). On obtient ainsi une préparation de fibres composée de mitochondries intactes. A partir des fibres perméabilisées, on réalisera les tests suivants : test au cytochrome C dans le but d'étudier l'intégrité de la membrane externe mitochondriale, test à la créatinine pour éliminer une lésion ischémique, une cinétique de la respiration mitochondriale avec l'ADP. A partir de cette cinétique, on détermine la V_0 ou consommation d'oxygène (nmol O_2 /min/mg tissu sec) sans ADP, V_{max} en présence d'ADP et le K_m pour l'ADP. Enfin, en fonction des données acquises, en utilisant des substrats et des inhibiteurs spécifiques, on pourra aisément déterminer les activités des différents segments de la chaîne respiratoire mitochondriale.

7.2. Evaluation des sujets

L'évaluation initiale et finale est réalisée après signature du consentement éclairé et est faite à J0 et J90 en Hôpital de Jour du Département de Médecine Aiguë Spécialisée au 4^{ème}D ou au Centre d'Investigations Cliniques (CIC, INSERM) pour les témoins et les transplantés pulmonaires. Ces évaluations s'intègrent au programme de surveillance réglée de ces patients évitant ainsi tout déplacement supplémentaire pour cette étude.

Ces explorations sont réalisées deux fois chez les témoins. Sont relevés les données anthropométriques : âge, sexe, poids, taille et composition corporelle par impédancimétrie [83]. ECG, VEMS, CV sont enregistrés. Un questionnaire de qualité de vie SF36 est administré. Une épreuve d'effort maximale est réalisée après un échauffement de 5 minutes, par paliers de 20 watts et de 1 minute jusqu'à la capacité maximale de chaque individu. Une lactatémie est prélevée à la fin de l'exercice. Une épreuve d'endurance est réalisée à 80% de la puissance maximale atteinte lors du premier test.

Une mesure de la force du quadriceps est réalisée avant et après l'épreuve d'endurance. De façon à rendre cette mesure peu coopérante et éviter la variabilité liée aux difficultés d'obtention d'une contraction maximale reproductible (coopération dépendante, recrutement variable d'agonistes et antagonistes selon les sujets apportant une contribution non quantifiable à la force mesurée), une mesure de force maximale en réponse à une stimulation magnétique du quadriceps sera réalisée. Cette méthode réalise une stimulation supra maximale unique du nerf fémoral et induit une contraction brève (secousse musculaire unique, ('twitch' tension) du muscle quadriceps). Cette méthode a l'intérêt de ne stimuler que les fibres efférentes du nerf et constitue une méthode indolore (à la différence, par exemple, de la stimulation électrique du nerf utilisée en électrophysiologie classique qui active également des fibres sensibles). Le champ magnétique induit ne contre-indique pas l'utilisation en cas d'implants métalliques (clous, vis, plaques) mais, en raison de sensations et stimulations sensitivo-sensorielles modifiables, cet usage ne sera pas réalisé en cas d'implants métalliques (prothèse de hanches). En pratique, le sujet est assis en position neutre, genou à 90°. L'activation préalable du nerf fémoral (facilitation) est évitée en soutenant le talon du sujet en position neutre à 90°. Cette méthode est appliquée à deux reprises au repos puis après test d'effort en endurance selon procédures ci dessus.

B. Techniques d'étude de la fonction mitochondriale

1. Principe général du fonctionnement du polarographe à oxygène ou électrode à oxygène

Le polarographe à oxygène ou oxygraphe permet la mesure à tout moment de la concentration en oxygène d'un milieu liquide.

Les mesures de respiration mitochondriale sont effectuées à 25 °C dans la chambre de respiration (volume final 2 ml).

L'appareil se compose :

- d'une anode d'argent et d'une cathode d'or reliées par un pont de KCl et séparées d'une cellule de mesure par une membrane de téflon perméable à l'oxygène
- d'un boîtier de polarisation de l'électrode de mesure
- d'un potentiomètre enregistreur

Celle-ci est imperméable à l'eau et aux ions, ce qui garantit la constance de la concentration de la solution de KCl, mais perméable au dioxygène dissous dans le milieu. L'électrode est polarisée sous une tension de 0,6 volt. Dans ces conditions, le dioxygène est réduit en eau par les électrons délivrés par la cathode en platine.

Le principe de la méthode consiste à mesurer le courant électrique (i) qui provient de la réaction d'oxydoréduction faisant intervenir l'oxygène dissous, l'électrode polarisée (ici la cathode d'or) et la réaction d'oxydation d'une anode d'argent.

Les réactions au niveau des électrodes se traduisent par une oxydation de l'argent et une réduction de l'oxygène sur le platine.

Lorsqu'une différence de potentiel est appliquée aux électrodes, l'argent (anode) perd des électrons selon la réaction



L'oxygène qui diffuse à travers la membrane est réduit au niveau de l'électrode d'or. Le courant ainsi produit est proportionnel à la concentration en oxygène dissous.

Toute variation de concentration en oxygène dans la solution produira une variation d'intensité du courant mesurable à l'aide d'un enregistreur.

Dans la pratique, pour mesurer des variations de teneur en oxygène dans des solutions, on polarise l'électrode de mesure et on maintient constante la tension de polarisation (maintenue à 0,6 V) tout au long de l'expérimentation.

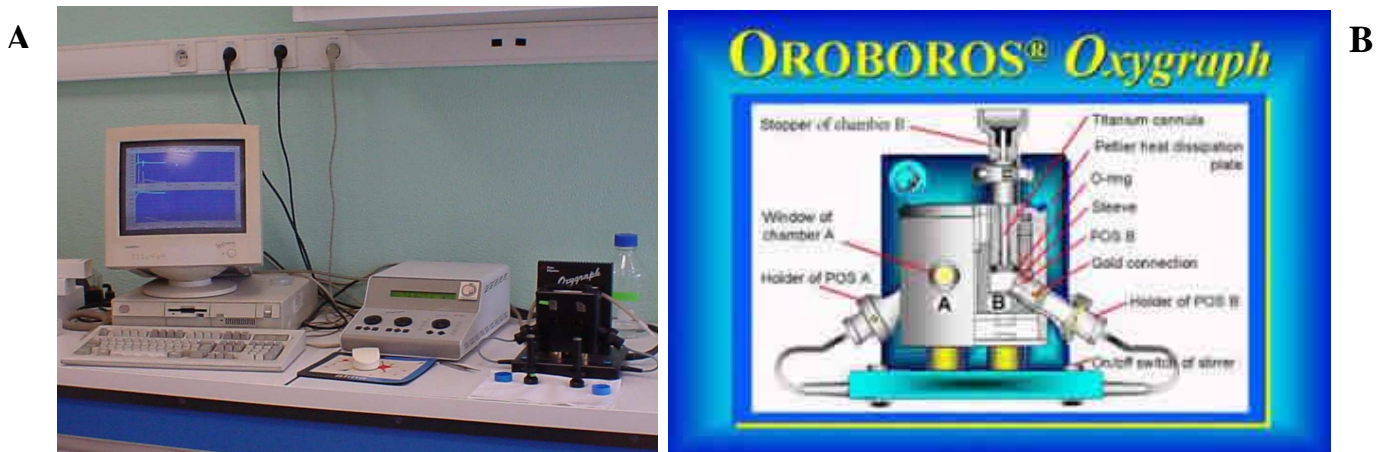
Pour une valeur donnée de cette tension il y a une relation linéaire entre le courant produit (i) et la concentration en oxygène de la solution soit $i = k (O_2)$.

Pour chaque expérience l'électrode est calibrée à 100 % d'oxygène (pourcentage d'oxygène qui correspond à la concentration maximale en O_2 d'une solution saturée d'air à la température de l'expérience).

L'agitation constante du milieu assure une distribution homogène de l'oxygène dans la chambre. La consommation d'oxygène et sa dérivée (le flux) sont visualisées sur un ordinateur relié à l'oxymètre.

La solubilité de l'oxygène à 25°C est de 215 nmoles O_2 par ml.

Fig. 32. Schéma du dispositif expérimental. (A). Photo de l'ensemble de la plate forme d'oxygraphie. (B). Schéma de la composition de l'oxygraphe. (D'après <http://www.orooboros.at/>)



Pour l'étude des mitochondries *in situ*, on a recours à plusieurs tests oxygraphiques.

2. Tests oxygraphiques utilisés

□ Test KCl

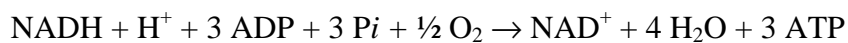
Il s'agit d'un test d'intégrité de la membrane externe mitochondriale.

Les fibres sont mises en présence d'ADP pour stimuler la respiration. On ajoute ensuite du cytochrome c pour voir l'effet de celui-ci sur la respiration. Si la vitesse de respiration augmente, cela signifie que le cytochrome c exogène réagit avec la cytochrome c oxydase.

Dans la solution KCl, le cytochrome c se dissocie de la surface externe de la membrane interne et si la membrane externe est endommagée il peut quitter l'espace intermembranaire ce qui se traduit par une diminution du taux de respiration (observé par l'addition d'ADP 2 mM). Cependant l'addition de cytochrome c exogène restaure complètement la respiration sous ces conditions.

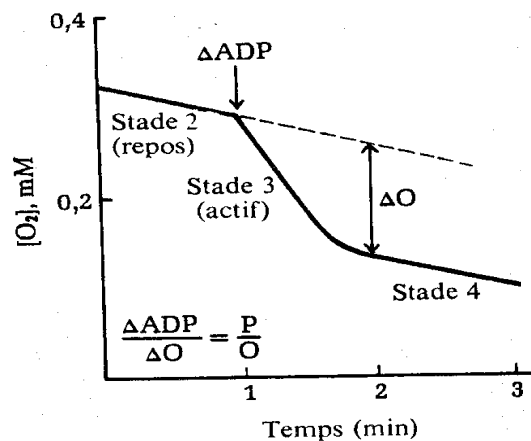
□ Acceptor Control Ratio (ACR)

L'équation de la phosphorylation oxydative indique que le phosphate et l'ADP sont nécessaires au transport de l'électron du NADH vers l'oxygène :



Sans l'accepteur (l'ADP), l'intensité de la respiration est très faible et ne s'accompagne d'aucune phosphorylation en raison de l'absence de l'accepteur de phosphate. Cette condition connue sous le nom de *stade 2 de respiration* représente l'état de repos de la respiration, la membrane interne est alors polarisée de façon maximale.

Fig. 33. Tracé oxygraphique des stades 3 & 4 de respiration



Lorsqu'une quantité connue d'ADP est ajoutée, la consommation d'oxygène s'élève rapidement jusqu'à un maximum; parallèlement l'ADP est phosphorylé en ATP et le $\Delta\Psi$ diminue. Ces conditions sont appelées *stade 3 de respiration* ou respiration active. Lorsque tout l'ADP a été phosphorylé, la vitesse de respiration chute pour revenir à l'état de repos après ATP ou *stade 4 de respiration*.

Ce phénomène dans lequel la vitesse du transport électronique est contrôlée par la concentration en ADP est appelé *contrôle par l'accepteur* ou à un sens plus large contrôle respiratoire. Le rapport du contrôle par l'accepteur (ou accepter control ratio) est le rapport entre l'intensité de la respiration de la mitochondrie en présence d'un excès d'ADP à l'intensité de la respiration en l'absence d'ADP. Ce rapport est normalement élevé jusqu'à 10 dans les mitochondries intactes et peut atteindre 1 dans des mitochondries endommagées, qui ont perdu leur capacité à phosphoryler l'ADP. Expérimentalement, il consiste à ajouter sur la préparation à étudier la concentration d'ADP maximale responsable de la V_{max} (soit 2 mM). Le rapport entre la V_{max} et la V_0 (vitesse de respiration basale de l'échantillon) correspond à l'ACR.

□ Effet Créatine

Ce test a pour but de voir si le couplage entre la Créatine Kinase mitochondriale (miCK) et l'ANT (Adénine Nucléotide Translocase) est intact. La miCK se trouve dans une position qui lui permet de réguler le flux métabolique entre la mitochondrie et le cytoplasme, et de répondre de façon adéquate à une demande d'énergie par les muscles oxydatifs. La Créatine Kinase mitochondriale est située dans l'espace intermembranaire, accolée à la face externe de la membrane interne de la mitochondrie. Elle fonctionne de façon couplée avec l'ANT. L'ATP produit par la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie va, à travers l'ANT, passer dans l'espace intermembranaire et sera utilisé par la miCK pour le renouvellement de l'ADP nécessaire pour stimuler la respiration mitochondriale. Cet ADP va regagner la matrice via l'ANT. Tout changement au niveau de la morphologie de la membrane, particulièrement le gonflement des mitochondries par augmentation de P_i pendant l'ischémie myocardique, provoque la dissociation de la Créatine Kinase et élimine l'efficacité de la stimulation de la respiration par la créatine. Ceci est un des meilleurs indicateurs des dommages ischémiques du cœur.

Dans les fibres perméabilisées intactes, l'addition de créatine en présence d'ADP 0,1 mM stimule la respiration par activation de la miCK qui régénère l'ADP localement, dans l'espace intermembranaire à partir de créatine et d'ATP nouvellement synthétisé par la mitochondrie.

□ Cinétique de respiration

Le principe de ce test est de déterminer des paramètres cinétiques tels que le K_m pour l'ADP (affinité apparente pour l'ADP) et la V_{max} (vitesse maximale de respiration). La respiration est stimulée successivement par des concentrations croissantes d'ADP exogène de 0,05 mM à 2 mM.

Cela permet de calculer les constantes cinétiques.

Fig 34. Tracés représentatifs de la consommation d'oxygène pour différentes concentrations d'ADP dans la solution B (M). (A). la concentration en mitochondries isolées utilisée est de 60 μg de protéines mitochondriales/ml de suspension. (B). le poids sec des fibres perméabilisées utilisées pour les mesures est de 1 mg. Glutamate (5 mM) et malate (2 mM) ont été utilisés comme substrats respiratoires. (D'après Saks et al., 2003)

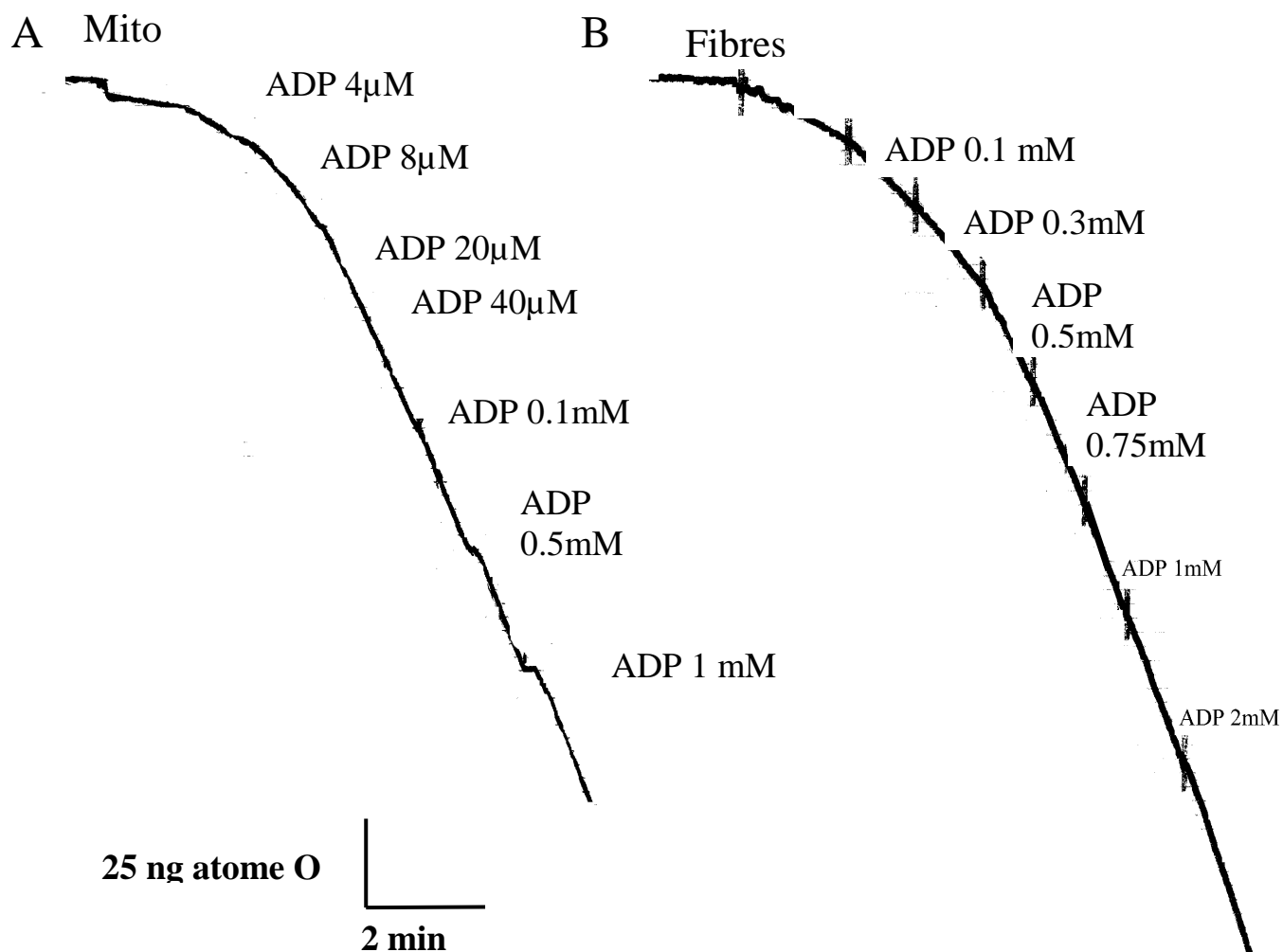
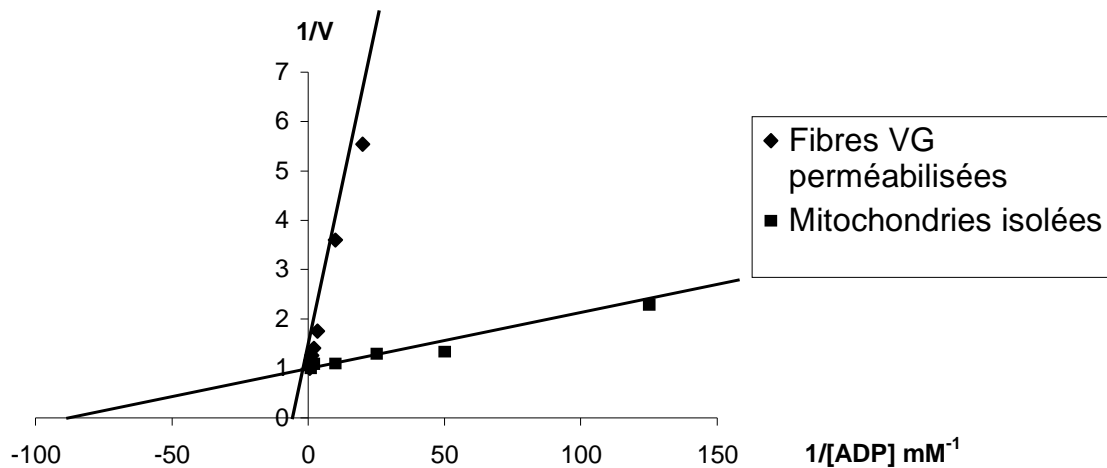


Fig. 35. Représentation de Lineweaver-Burk des résultats cinétiques sur mitochondries isolées et sur fibres perméabilisées. Cette représentation en double inverse permet de rendre compte de la différence entre les mitochondries isolées et *in situ*. L'intersection entre l'axe des abscisses et la droite donne la valeur négative de l'inverse du K_m ($-1/K_m$) tandis que l'intersection entre l'axe des ordonnées avec la droite correspond à l'inverse de la V_{max} . Seul, le K_m est modifié suivant que l'on étudie les mitochondries *in situ* ou isolées. (D'après Saks et al., 2003)



□ Test PEP/PK (PhosphoEnolPyruvate / Pyruvate Kinase)

Il s'agit d'utiliser un système piège pour l'étude de la canalisation métabolique de l'ADP endogène. Ce dernier peut être produit par les systèmes enzymatiques intracellulaires compétents (tels que les ATPases myofibrillaires ou du réticulum sarcoplasmique). L'ADP endogène synthétisé peut : soit être capté par ce système dans le cytoplasme pour être transformé en ATP, soit être utilisé par la mitochondrie pour stimuler la respiration.

Le test permet de mettre en compétition la mitochondrie et le système piège.

Ces mesures de respiration sont effectuées avec concentration de 20 UI de l'enzyme PK.

La respiration est stimulée de nouveau par l'ajout de créatine ou d'AMP. En effet, la créatine permet de synthétiser de l'ADP endogène, dans l'espace intermembranaire, grâce aux CK mitochondriales et l'AMP via les Adénylate Kinases (AK).

3. Principe de la spectrophotométrie

On utilise la spectrophotométrie pour calculer l'activité d'une enzyme de manière indirecte en faisant appel à un système couplé. Ces systèmes offrent la possibilité de suivre l'activité de l'enzyme suivant l'addition de divers réactifs tels que activateurs ou inhibiteurs.

Cette méthode est basée sur la propriété d'absorbance de certaines molécules à des longueurs d'onde données.

Il existe une relation linéaire entre l'absorbance et la concentration des molécules dans une certaine limite déterminée par la loi de Lambert-Beer :

$$A = \epsilon \cdot L \cdot C$$

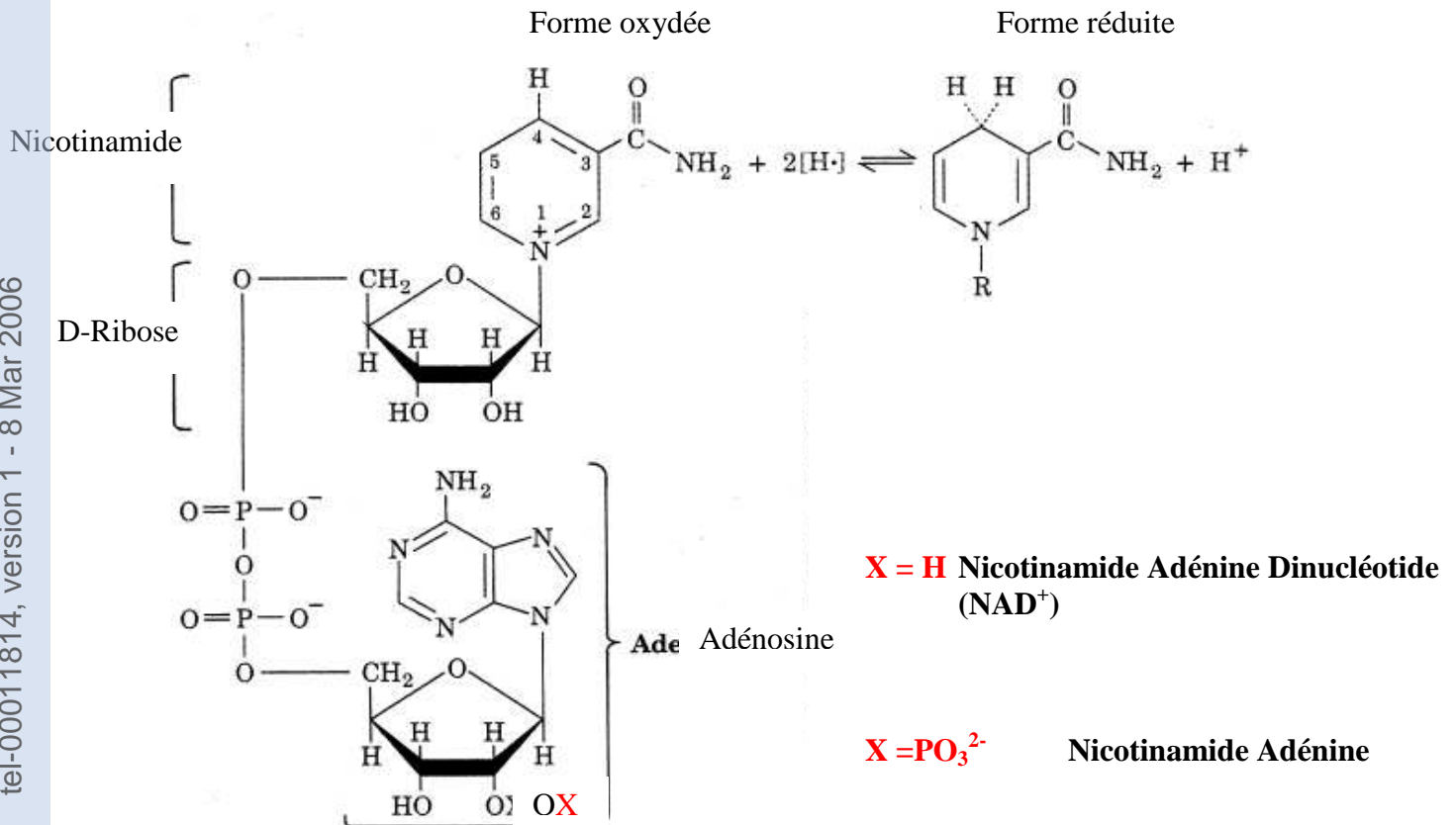
Avec: **A** = absorbance sans unité

ϵ = coefficient d'extinction molaire en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, constante caractéristique pour chaque molécule

L = longueur du trajet optique dans la cuve en cm (généralement $L = 1 \text{ cm}$)

C = concentration de la molécule en mM

Fig. 36. Formes oxydées et réduites du NADP et du NADH

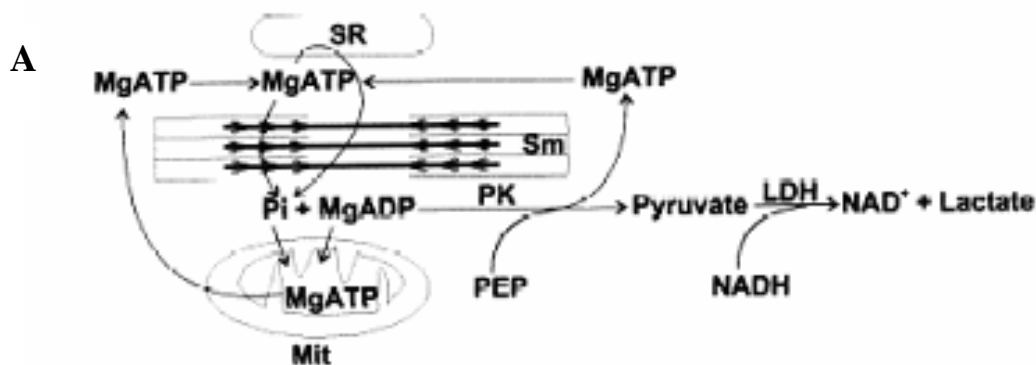


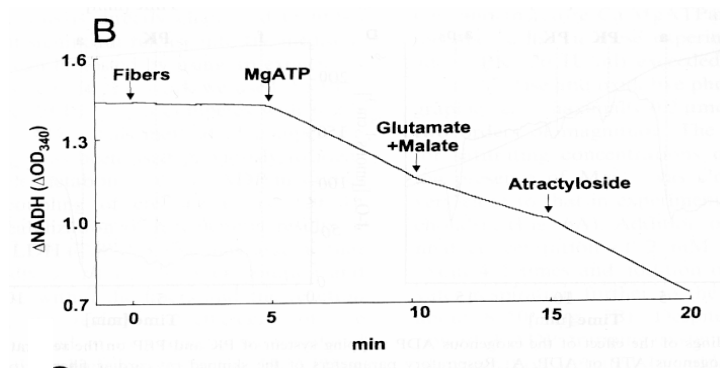
4. Utilisation d'un système d'enzymes couplées

Pour mesurer l'activité des MgATPases dans les préparations de fibres perméabilisées ou de mitochondries isolées, un système couplé a été utilisé. Il s'agit du système couplé pyruvate kinase (PK) / lactate deshydrogénase (LDH). L'ATP passe la membrane externe mitochondriale grâce au canal VDAC. Il rentre dans le compartiment matriciel via un transporteur localisé dans la membrane interne : l'ANT (Adénine Nucleotide Translocase) qui peut être inhibé par l'atractyloside (ATR). Ensuite, l'ATP est hydrolysé dans la matrice par la F₀F₁ ATPase. L'oligomycine est un inhibiteur de la sous-unité F₁. L'ADP synthétisé peut être échangé avec l'ATP dans la membrane interne mitochondriale par l'intermédiaire de l'ANT. L'ADP est requis pour la synthèse de pyruvate à partir de PEP grâce à la PK (Pyruvate

Kinase). Le pyruvate est un substrat pour la LDH (Lactate Deshydrogène) et il permet à la réaction de continuer en réduisant le pyruvate en lactate et en oxydant le NADH en NAD⁺. Le niveau d'absorbance du NADH peut être suivi en mesurant la densité optique (D.O) à 340 nm. Cela nous donne une idée de l'activité de l'ATPase car la synthèse d'ADP et l'oxydation du NADH sont corrélées de manière stœchiométrique. Les fibres perméabilisées ou les mitochondries (concentration finale de 30 µg/ml) sont ajoutées et la réaction a lieu dans la cuve contenant de la solution B(M) ainsi que : 2 mg/ml de BSA, 1 mM d'ATP, 0,3 mM de NADH, 1 mM de phosphoénolpyruvate et 4-5 IU/ml de chacune des enzymes pyruvate kinase et lactate deshydrogène. Ceci permet de mesurer le taux de réaction de la MgATPase dans la matrice mitochondriale (sensible à l'atractyloside, ANT-dépendante), catalysée par F₀F₁ dû au découplage de la membrane interne mitochondriale (Fig.1). Les activités sont données en µmol . min⁻¹ . (mg de protéine)⁻¹ à 25°C. L'autozéro est effectué avec la solution B(M) puis le système est testé *in vitro*. Il s'agit de rajouter de l'ADP exogène afin de shunter la réaction de la MgATPase et ainsi de vérifier l'état du système couplé pour oxyder le NADH.

Fig. 37. Changements de la vitesse de relargage de l'ADP des fibres cardiaques et son flux à travers le système PK/LDH en activant ou inhibant la respiration mitochondriale. (A). Schéma des réactions des ATPases couplées soit à la phosphorylation oxydative soit à la rephosphorylation de l'ADP par le système extramitochondrial PEP/PK. (B). Enregistrement original des changements du flux d'ADP à travers le système PEP/PK estimé comme la diminution de NADH dans le milieu, avant et après différentes additions : ATP 1 mM, substrats (glutamate 10 mM et malate 5 mM) et atractyloside 98 µM. (D'après Seppet et al., 2001).





Toutes les mesures ont été effectuées sur un spectrophotomètre Uvikon 941 plus (Kontron Instruments, UK), à 340 nm, à 25°C, sous agitation, et les durées de cinétique ont été fixées à 2 minutes par mesure.

Le volume final dans les cuves est de 2 ml.

C. Techniques d'imagerie intracellulaire

1. Principe de la microscopie confocale et biphotonique

La microscopie confocale

Une des limitations de la microscopie classique est la faible profondeur de champ de l'image. La zone observée de mise au point est nette, les zones immédiatement au dessus et au dessous sont floues et perturbent l'image observée. La parade à cela consiste à faire des préparations très fines de l'ordre du micron en microscopie électronique, 2 à 3 μm en microscopie optique.

La microscopie confocale est basée sur la microscopie à fluorescence (c'est donc une technique de microscopie optique), mais la lampe à lumière blanche est remplacée par un laser, qui fournit une lumière parfaitement cohérente. Le laser est focalisé sur la préparation et seule la zone de focalisation sera suffisamment excitée pour émettre de la fluorescence, le reste de la préparation, que se soit sur les cotés ou sur un autre plan de focalisation, reste sombre. En balayant par le laser tout le plan de focalisation, on obtient une image très nette de ce plan focal, les zones floues n'apparaissent plus.

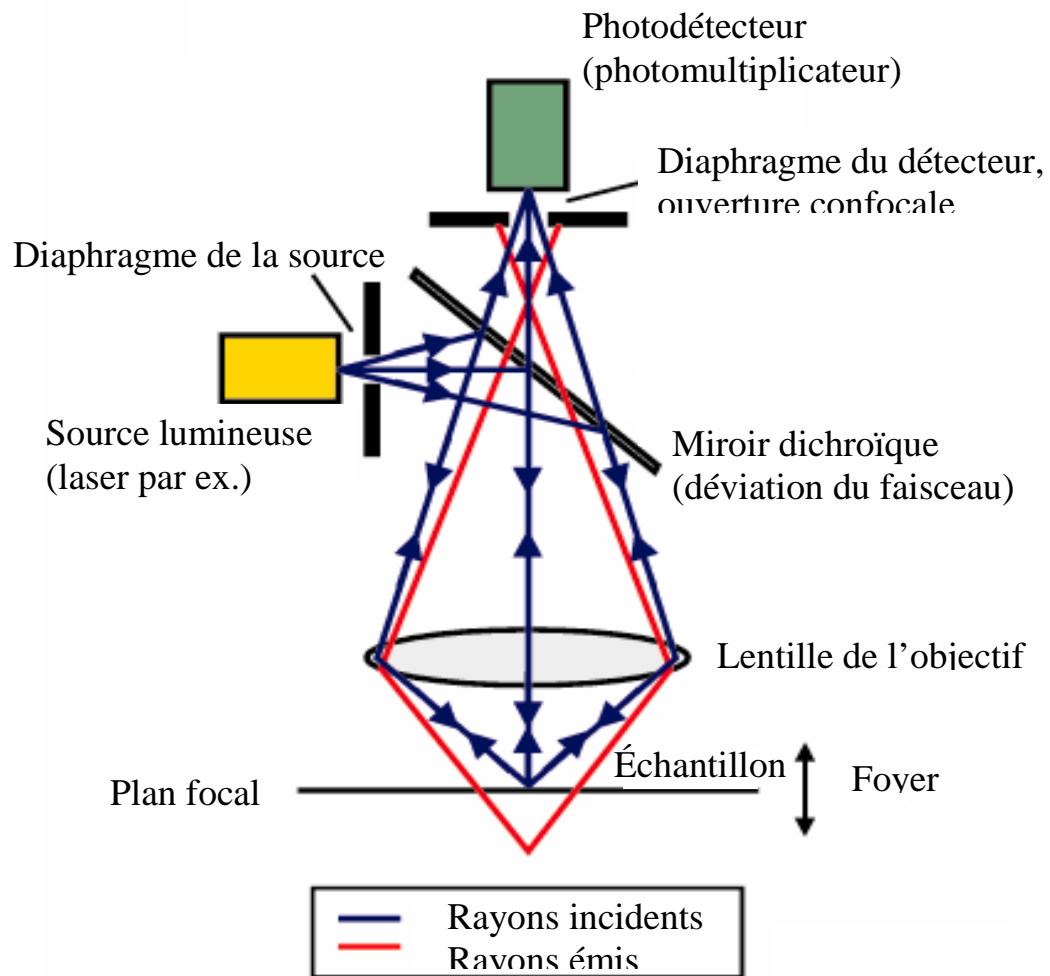
Entre chaque balayage, le plan focal peut être modifié pour traiter toute l'épaisseur de la préparation. On dispose alors de la luminosité de tous les points de la préparation qui peuvent être utilisés de plusieurs façons :

- En exploitant les coupes une à une, on peut étudier les connexions entre les différents éléments observés sur la préparation.
- En reconstituant une image nette sur une épaisseur pouvant atteindre plusieurs microns, les éléments longitudinaux tels que les fibres cardiaques peuvent être suivis sur leur longueur sans interruption.

Le microscope confocal est construit sur un microscope à fluorescence standard qui fournit l'optique auquel se rajoute un système spécial de traitement du rayon laser.

Fig. 38. Le microscope confocal : principe de fonctionnement

d'après [Lance Ladic](#), Dept. of Physiology, U.B.C., Canada



Après émission, le rayon laser (contenant seulement deux à trois fréquences) est renvoyé sur la préparation par deux miroirs actionnés par des moteurs piézo-électriques. Ces miroirs, en vibrant de manière parfaitement contrôlée assurent le balayage de la préparation. La lumière laser déjà cohérente est focalisée par l'objectif, seul le pixel se trouvant au point de focalisation sera suffisamment excité pour émettre de la lumière. La lumière émise par la préparation repart par le même chemin, mais un miroir dichroïque l'empêche de remonter jusqu'à la source laser et la dévie vers le système optique spécial. Celui-ci contient une série de miroirs qui replie le rayon, puis un second miroir dichroïque sépare les différentes fréquences du rayon émis (ce qui permet de réaliser deux marquages simultanément. Les rayons sont captés par deux photorécepteurs qui détectent l'intensité lumineuse de l'émission. Le résultat des photorécepteurs est envoyé à un ordinateur qui assure le traitement de l'image. Juste avant chaque photorécepteur un trou extrêmement fin, le pinhole (trou d'aiguille en

anglais) diaphragme le rayon afin d'éliminer les rayons qui sont légèrement hors de l'axe. Ce trou diminue la luminosité de l'image (ce que l'ordinateur peut compenser) mais en revanche, il augmente fortement la résolution du système en éliminant la lumière des points de la préparation situés à proximité immédiate du point focal. Le microscope confocal s'approche de la limite théorique de résolution d'un système optique plus près que n'importe quel autre microscope.

Parmi les différents avantages de la microscopie confocale, la possibilité de travailler avec des échantillons épais comme les fibres perméabilisées n'est pas le moindre. La réalisation de coupes selon l'axe Z, possibles dans ce cas, permet de connaître la structure interne de la préparation et l'organisation des ICEUs. Les images peuvent être séquencées, donnant une indication à la fois spatiale mais aussi temporelle du niveau d'énergisation des mitochondries au sein des ICEUs, mais également d'une unité à une autre.

La microscopie biphotonique

La microscopie biphotonique décrite pour la première fois en 1990 (Denk, 1990) repose sur un mécanisme très particulier d'interaction entre la lumière et les molécules chromophores. Les conséquences physiques de ce mécanisme apportent des avantages uniques en biologie par rapport à toutes les autres méthodes d'imagerie conventionnelles.

Classiquement, la fluorescence d'une molécule résulte d'un processus relativement bien connu. Schématiquement, un photon est absorbé, portant la molécule dans son état excité d'où elle se désexcite en rayonnant un photon fluorescent. Ce processus classique d'excitation nécessite que le photon d'excitation ait la "bonne" couleur, ou autrement dit qu'il apporte exactement la quantité d'énergie nécessaire à la transition, ni plus ni moins. La microscopie biphotonique repose sur une idée très simple: au lieu d'apporter l'énergie de la transition par un photon unique, on l'apporte par deux photons d'énergie moitié. Une fois excitée, la molécule va alors rayonner un photon fluorescent, exactement de la même façon que si elle avait été excitée par un photon unique. La base du mécanisme de fluorescence biphotonique est là, qui ne se distingue de la fluorescence classique que par la façon d'exciter. Ce type d'excitation nécessite des sources laser d'un type très particulier, produisant des impulsions ultra brèves très intenses. Les caractéristiques du rayonnement émis par le chromophore sont inchangées. Pour obtenir des images à l'aide d'un microscope biphotonique, il suffira de balayer l'échantillon avec un faisceau focalisé dans le plan d'intérêt. La notion d'excitation biphotonique, s'étend aux ordres supérieurs, en apportant par exemple l'énergie de transition

sous forme de 3 photons d'énergie $1/3$, ou plus. On parle de fluorescence multiphotonique, concept qui permet d'étendre considérablement les champs d'applications. On utilise également la notion de microscopie de fluorescence non-linéaire, pour la raison que les mécanismes d'excitation impliquant deux ou plusieurs photons ont une efficacité qui n'est plus proportionnelle à l'intensité de la source d'excitation -comme les mécanismes classiques à un photon-, mais à son carré, ou des puissances plus élevées de cette intensité. Le concept général d'excitation non-linéaire s'applique du reste aussi à d'autres phénomènes que la fluorescence, bien au-delà de la seule fluorescence biphotonique qui en est historiquement la première réalisation (Denk, 1990).

Dans ce contexte très général d'excitation non-linéaire apparaît une conséquence fondamentale du point vue pratique pour la formation d'image : l'excitation est strictement restreinte au volume focal. Autrement dit, tout se passe comme si la lumière d'excitation se propageait jusqu'au plan focal sans interagir avec l'échantillon. L'interprétation de cette localisation est liée au fait que l'excitation multiphotonique nécessite un flux très élevé qui n'est réalisé que dans le volume focal.

Cette propriété d'excitation strictement restreinte au volume focal se traduit par plusieurs conséquences pratiques immédiates.

Tout d'abord, les processus de photoblanchiment (photobleaching) et de phototoxicité, souvent limitants en imagerie de fluorescence confocale ou conventionnelle seront ici limités au minimum nécessaire. Puisque toute la fluorescence excitée provient du volume focal, elle est utilisable en totalité pour construire l'image, à la différence de la microscopie confocale qui excite de la fluorescence tout au long de l'axe optique, pour ne "garder" que celle qui provient du volume focal.

Les photons d'excitation, typiquement situés dans l'infrarouge proche -700 à 1000nm- sont moins énergétiques que les photons employés en fluorescence linéaire; les conséquences sont que le rayonnement d'excitation -comparé aux UV par exemple- est moins destructeur, et pénètre plus profondément dans les tissus -jusqu'à 0,5 mm environ. Enfin, de ce qui précède, il ressort que la microscopie non-linéaire, et la fluorescence biphotonique en particulier, permet de réaliser, dans la limite de pénétration, une biopsie optique du plan de mise au point comme si ce plan était à la surface de l'échantillon.

L'utilisation d'une source biphotonique permet, d'une part d'atténuer le phénomène de *photobleaching* et, d'autre part, assure une meilleure pénétration du signal lumineux dans l'épaisseur de l'échantillon. Enfin, l'énergie utilisée pour l'excitation est 2 fois plus faible (2

fois 700 nm) ce qui rend le laser beaucoup moins nocif pour les préparations cellulaires et permet d'observer leurs propriétés physiologiques plus longtemps et de manière plus stable.

L'utilisation simultanée de la microscopie confocale et biphotonique nous offre la possibilité de visualiser sur 2 canaux différents les signaux de fluorescence du NAD(P)H et des flavoprotéines.

Méthodologie

Autofluorescence des flavoprotéines et du NADH (Biophys J)

Les images digitales des flavoprotéines mitochondriales ont été prises par un microscope confocal LSM 510 NLO (Zeiss) avec un objectif à immersion à eau 40x (NA 1.2). L'immersion à eau a pour but d'empêcher des aberrations géométriques lors de l'observation *in vitro* de cellules vivantes. L'autofluorescence des flavoprotéines est obtenue par excitation avec un laser argon à 488 nm, la puissance générée par le laser a été fixée en moyenne à 8 mW. La fluorescence a été collectée par un miroir dichroïque laissant passer les longueurs d'onde supérieures à 510 nm et un second filtre laissant passer les longueurs d'onde entre 505 et 550 nm. L'autofluorescence du NADH a été excitée par une absorption biphotonique en utilisant un laser infra-rouge pulsé à la femto-seconde (Tsunami+MilleniaVIII, SpectraPhysics). La fréquence de pulsation a été fixée à 100 MHz d'une durée de 100 femto-seconde. L'infra-rouge a été réglé à 720 nm en donnant un maximum d'absorption biphotonique à 360 nm. La puissance du laser a été fixée à 400 mW en moyenne. Les signaux de fluorescence ont été collectés par une fente avec un maximum de réflexion du faisceau pour 488 nm \pm 10 nm (pour la ligne de rejet à 488 nm) et au-dessus de 700 nm (pour le rejet de l'excitation infra-rouge). Une deuxième fente a été utilisée pour séparer le signal du NADH de celui des flavoprotéines. Le signal des flavoprotéines passe à travers d'un filtre laissant passer les longueurs d'onde comprises entre 500 et 550 nm suivi d'un filtre de rejet infra-rouge avant d'être collecté à travers un pinhole. Le signal du NADH est redirigé, lui, vers un filtre laissant passer les longueurs d'onde entre 390 et 465 nm avec un filtre additionnel infra-rouge.

Les fibres perméabilisées offrent la possibilité d'étudier la localisation des mitochondries dans leur contexte physiologique, permettant ainsi l'approche de la régulation intercellulaire de l'hétérogénéité mitochondriale.

Les cardiomyocytes, quant à eux, permettent une meilleure définition de l'observation de l'énergisation des mitochondries (régulation intracellulaire) car les cellules isolées représentent une population plus homogène. Il y a également moins de problèmes de diffusion des substrats qui se fait plus facilement que dans des fibres.

Les expériences sont réalisées dans des chambres Heraeus-FlexiPerm® (Hanau, Allemagne) ouvertes, offrant ainsi, une accessibilité complète des fibres ou cardiomyocytes à l'oxygène. Les différentes préparations sont mises dans un puits afin d'être en contact avec le milieu qui est la solution de respiration (200 µl) utilisée en oxygraphie, ceci préservant la fonctionnalité des mitochondries au sein des cellules. Les fibres perméabilisées peuvent être attachées par leurs extrémités afin qu'elles restent fixes sous l'objectif. Les cardiomyocytes, en revanche, sédimentent au bout de quelques secondes. Il est ensuite possible de les suivre tout comme les fibres perméabilisées.

La calibration du signal peut être réalisée soit sur des fibres de ventricule gauche perméabilisées à la saponine, soit sur des cardiomyocytes isolés de rat adulte, en présence de découplant (DNP ou FCCP) donnant l'oxydation maximale ou de cyanure permettant d'enregistrer le minimum de signal de fluorescence des flavoprotéines.

Sondes fluorescentes pour la visualisation des mitochondries

MitoTracker® green FM (Biophys J)

Les marqueurs de la famille des MitoTracker® sont des sondes spécifiques des mitochondries qui restent dans les mitochondries lors de la fixation et la perméabilisation des cellules. A l'inverse, les sondes classiques utilisées pour marquer les mitochondries (tétraméthylrhosamine et rhodamine 123) sont séquestrées tant que demeure un potentiel membranaire et ressortent des organites lorsque celui-ci disparaît. Cette caractéristique limite leur usage dans certaines expériences dans lesquelles les cellules doivent être fixées avec des

fixateurs aldéhydiques ou d'autres agents qui affectent l'état énergétique des mitochondries. Les marqueurs permanents Mitotracker[®] contiennent un résidu chlorométhyl qui réagit avec les groupements thiols. Une fois que le Mitotracker[®] s'est accumulé dans la mitochondrie, il peut réagir avec les groupements thiols accessibles des peptides et protéines pour former des conjugués se fixant aux aldéhydes.

Le Mitotracker[®] green FM possède l'avantage d'être non fluorescent dans les solutions aqueuses, et de devenir fluorescent quand il s'accumule dans l'environnement lipidique des mitochondries. De ce fait, le bruit de fond de la fluorescence est négligeable, permettant aux chercheurs de visualiser les mitochondries dans les cellules vivantes sans lavage préalable.

Rhod-2 AM et Mitotracker Red CMXRos (Am J Physiol Cell Physiol)

Toutes les préparations ont été observées en utilisant un microscope confocal Leica DM IRE2 (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) avec une lentille à objectif X63 à immersion à eau.

Deux méthodes indépendantes ont été utilisées pour visualiser la position des mitochondries : la visualisation du calcium matriciel par la sonde Rhod-2 AM et la visualisation du potentiel de membrane mitochondrial par la sonde Mitotracker Red CMXRos.

- Visualisation des mitochondries par Rhod-2 AM

Rhod-2 AM est un fluorophore semblable à la rhodamine 123 dont les maximum d'excitation et d'émission sont 557 nm et 581 nm respectivement (lasers Ar et Kr comme sources d'excitation).

Les fibres de muscle squelettiques non perméabilisées sont incubées dans des boîtes 24 puis avec 5 μ M de Rhod-2 AM dans la solution A pendant 1h à 4°C en présence de substrats exogènes (glutamate 5 mM et malate 2 mM).

- Visualisation des mitochondries par le Mitotracker Red CMXRos

Le Mitotracker Red CMXRos est un dérivé de la x rosamine dont les maximum d'excitation et d'émission sont respectivement 579 et 599 nm.

Les fibres de muscle squelettiques non perméabilisées sont incubées dans des boîtes 24 puis avec 100 nm de Mitotracker Red CMXRos dans la solution A pendant 2h à 4°C en présence de substrats exogènes (glutamate 5 mM et malate 2 mM). Les cardiomyocytes sont incubés avec 100 nm de Mitotracker Red CMXRos dans la solution A pendant 45 min à 4°C en présence de substrats exogènes (glutamate 5 mM et malate 2 mM) dans les puits du Flexiperm®.

2. Technique d'immunofluorescence indirecte

Il s'agit du principe d'immunofluorescence indirecte.

La méthode s'appuie sur l'utilisation d'un anticorps (Ab) I^{aire} spécifique de la protéine à étudier et d'un anticorps II^{aire}, qui se fixe sur l'anticorps I^{aire} et qui est fluorescent.

Principe d'une réaction immunocytochimique

Une immunoréaction est composée de trois éléments :

1. la préparation (tissu, cellule, organite subcellulaire, virus ...) contenant l'antigène (dans notre cas la protéine) à étudier.
2. le premier anticorps, ou anticorps primaire dirigé contre l'antigène recherché.
3. le système révélateur qui permet de visualiser l'immunoréaction, il s'agit de l'anticorps secondaire conjugué à un fluorophore.

Observation des marquages

Les images sont visualisées au microscope à fluorescence avec l'utilisation de filtres adéquats.

Ce type de microscope a la faveur des immunocytochimistes pour plusieurs raisons :

- la simplicité et la rapidité des marquages : pas d'étapes supplémentaires de révélation ou d'intensification nécessaires comme dans les techniques immunoenzymatiques ou à l'or colloïdal
- la grande sensibilité de nombreux traceurs fluorescents
- le contraste élevé des images
- le choix important de traceurs de couleurs différentes
- les réactions endogènes non spécifiques généralement plus faibles qu'avec les autres traceurs
- et, dans le cas où l'on désire marquer soi-même les anticorps, la très grande simplicité des techniques de préparation des conjugués anticorps-traceur fluorescents.

Protocole de marquage :

Les cardiomyocytes perméabilisés à la saponine sont fixés au paraformaldéhyde 2% pendant une nuit à 4°C. Ils subissent ensuite 2 rinçages au PBS/BSA 2%.

Anticorps I^{aires}

Les anticorps proviennent de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA) sauf la desmine et la protéine STOP.

- Desmine : Anticorps purifié anti-lapin préparé par le Dr L.Rappaport (INSERM unité 127, Hôpital Lariboisière, Paris, France)

La dilution utilisée est de 1/200 dans du PBS/BSA 2%, on laisse incuber pendant une nuit à 4°C, sous agitation, ensuite on effectue 2 rinçages dans du PBS/BSA 2%.

- β -Tubuline (H-235) : sc-9104 (anticorps polyclonal de lapin) (dilutions recommandées par le fournisseur : 1/200-1/1000)

La dilution utilisée est de 1/300 dans du PBS/BSA 2%, on laisse incuber pendant une nuit à 4°C, sous agitation, ensuite on effectue 2 rinçages dans du PBS/BSA 2%.

- STOP (23C/N) : anticorps purifié de lapin donné par le Dr. Annie Andrieux (DRDC, CEA Grenoble, France).

La dilution utilisée est de 1/400 dans du PBS/BSA 2%, on laisse incuber pendant une nuit à 4°C, sous agitation, ensuite on effectue 2 rinçages dans du PBS/BSA 2%.

Anticorps II^{aires}

- TRITC : Fragment F(ab)₂' d'un IgG (issu d'âne conjugué avec la Rhodamine TRITC) anti-lapin ou anti-chèvre (dilutions recommandées par le fournisseur : 1/50-1/200) dilution utilisée 1/50

- RedTM-X : IgG (issu d'âne conjugué avec la Rhodamine RedTM-X) anti-lapin (dilutions recommandées par le fournisseur : 1/50-1/200) dilution utilisée 1/50

La dilution utilisée est de 1/50 dans du PBS/BSA 2%, on laisse incuber pendant 4h à température ambiante, sous agitation.

On effectue ensuite 3 rinçages dans du PBS et 3 rinçages dans de l'eau ultrapure avant d'être déposées entre lame et lamelle. La suspension de montage est un mélange de mowiol et de glycérol auquel on a ajouté du 1,4-diazobicyclo-(2,2,2)-octane. Après un séchage de 3 jours minimum à l'obscurité, les échantillons sont observés au microscope confocal.

3. Distribution quantitative et qualitative des mitochondries dans les cellules musculaires

Les mitochondries des fibres de muscles squelettiques et des cardiomyocytes visualisés grâce aux sondes fluorescentes par microscopie confocale ont été individualisés manuellement en leur centre par des carrés après rotation des images prises pour que les fibres ou cellules aient toutes la même orientation verticale.

Un logiciel, réalisé par le Dr. M. Vendelin, calcule les coordonnées des mitochondries les unes par rapport aux autres (distribution directionnelle des distances) en considérant les coordonnées des centres des carrés comme étant celles des mitochondries.

Pour ce faire, l'espace autour de chaque mitochondrie est divisé en 8 secteurs de 45° chacun et le logiciel recherche pour chacune d'elles, la mitochondrie voisine la plus proche par rapport à son centre.

D. Modèle mathématique des restrictions de diffusion (Dr. M. Vendelin)

(Biophysical Journal, 2003)

Le modèle a été utilisé pour calculer les vitesses de respiration mitochondriales comme fonction de :

1. la concentration en ADP exogène
2. la concentration en ATP exogène comme source d'ADP endogène
3. pour analyser les différents effets du système PEP/PK sur la respiration avant et après un traitement des fibres musculaires à la trypsine.

On a fait varier deux paramètres décrivant la diffusion de l'ADP pour ajuster au mieux le modèle aux données expérimentales. Ces 2 paramètres sont **DF** : la fraction de diffusion et **PF** : la fraction de perméabilité décrivant la perméabilité de la membrane externe mitochondriale pour l'ADP.

Dans ce modèle, les vitesses de réaction de toutes les enzymes ont été réduites 4 fois comparées aux données de précédentes publications (Vendelin et al., 2000). Pour prendre en compte la différence de température (25°C dans cette étude au lieu de 37°C dans l'étude précédente). L'activité ATPase, V_{ATP} des fibres perméabilisées est estimée comme non périodique (fibres non contractées), mais stationnaire et dépendante des concentrations en MgATP et MgADP. La concentration en Pi est inchangée dans ce travail, il reste à 3 mM. La diffusion entre la fibre et la solution est simulée seulement en une coupe transversale. La coupe transversale a été remplie avec des mitochondries (diamètre 1 μm) qui ont été distribuées de manière aléatoire pour remplir un quart du volume de la fibre ceci en accord avec les images des flavoprotéines mitochondriales en microscopie confocale. Le chemin de diffusion d'un métabolite a été divisé en 3 parties :

- une diffusion restreinte de la solution à travers le cytoplasme et l'espace myofibrillaire jusqu'à la proximité de chaque mitochondrie avec un coefficient de diffusion D^{app}
- une diffusion passive à travers la membrane externe mitochondriale avec un coefficient de perméabilité $PF \times R$
- des échanges par transporteur de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale

Les concentrations en métabolites dans des mitochondries voisines sont différentes à cause des variations de concentrations des métabolites entourant chaque mitochondrie dans les compartiments myofibrillaire et myoplasmique. Les concentrations des métabolites dans la matrice mitochondriale ont été calculées à partir de leur concentration dans l'espace intermembranaire et par la cinétique du transport des nucléotides adényliques et du Pi (Vendelin et al., 2000). Les vitesses de respiration ont été calculées comme fonction des concentrations des métabolites dans la matrice mitochondriale (Vendelin et al., 2000). Puisque les concentrations sont différentes à l'intérieur de chaque mitochondrie, les vitesses de respiration le sont aussi. En comparant avec les données expérimentales, une moyenne de la vitesse de respiration a été utilisée.

Dans ce modèle, similaire à celui d'Aliev et Saks (1997), Vendelin et ses collaborateurs (Vendelin et al., 2000), ont assumé que le couplage fonctionnel ANT-MtCK se produit pour des concentrations locales en ATP et ADP élevées dans un microcompartiment étroit (« gap ») entre les enzymes couplées.

Des principes de base soutiennent la composition du modèle comme dans l'étude de Vendelin (Vendelin et al., 2000) :

1. On fait l'hypothèse que l'ANT transporte les nucléotides adényliques entre l'espace matriciel et le microcompartiment et partiellement l'espace intermembranaire
2. La MtCK est liée à l'ATP et à l'ADP à la fois dans le microcompartiment et dans l'espace intermembranaire
3. La diffusion entre le microcompartiment et l'espace intermembranaire est restreinte
4. A cause de la capacité infiniment petite du microcompartiment l'influx est considéré comme égal à l'efflux.

Le nouveau modèle de couplage MtCK/ANT est une version simplifiée de l'approche présentée auparavant (Vendelin et al., 2000), impliquant des mitochondries isolées avec l'ANT et la MtCK liés à la membrane interne. L'adéquation du modèle a été testée avec les données expérimentales obtenues à partir de mesures sur mitochondries isolées :

- 1) Dépendance du taux de production de PCr en fonction de la concentration en ATP mesuré pour différentes concentrations en Cr et PCr en présence de phosphorylation oxydative (Jacobus et Saks, 1982) ;
- 2) Après addition de PK dans la solution contenant des mitochondries respirant et du PEP, la diminution de la phosphorylation oxydative en fonction de l'activité de la PK a été détectée (Gellerich et Saks, 1982). Les activités relatives de la MtCK et de la PK ont été estimées à partir de la vitesse mesurée de la respiration mitochondriale en supposant que la vitesse de

réaction de la MtCK est égale à la vitesse de production de l'ATP par la phosphorylation oxydative (Jacobus et Saks, 1982) ;

3) Dans les mitochondries isolées , la réaction de la CK couplée à la phosphorylation oxydative conduit à la réversibilité de la réaction de la CK contrairement à une CK non compartimentalisée dans le cas de mitochondries qui ne respirent pas dans certaines conditions (Saks et al., 1975).

RESULTATS et DISCUSSION

1. Etude de l'organisation intracellulaire des mitochondries par imagerie confocale : approche qualitative et quantitative.

Les mitochondries des cellules cardiaques sont caractérisées par une organisation structurale très précise (Duchen et al., 1998; 1999, Appaix et al., 2003). Des études d'ultrastructure ont montré la localisation intracellulaire des mitochondries dans les cellules de muscles (Ogata et Yamasaki, 1997). Ces auteurs ont utilisé des muscles fixés au glutaraldéhyde et le procédé 'aldéhyde-osmium-DMSO-osmium' afin d'enlever la matrice et les myofilaments cytoplasmiques de la surface dans le but d'exposer de grands secteurs de mitochondries et du réticulum sarcoplasmique. L'observation de ces échantillons par la microscopie électronique à balayage à haute résolution a prouvé que, dans les fibres de muscle oxydatif, les mitochondries sont organisées en structures ou réseaux tridimensionnels (Kirkwood et al., 1986) et forment dans l'espace intermyofibrillaire, de multiples colonnes mitochondriales épaisses au niveau de la bande A, alors que dans les muscles blancs, les mitochondries sont localisées uniquement au niveau de la bande I près de la strie Z (Bessman et Geiger., 1981). Cette localisation différente se corrèle avec les différences dans la cinétique de la régulation de la respiration, où le K_m apparent pour l'ADP est largement plus bas dans le muscle à contraction rapide (glycolytique) que dans les fibres de muscle oxydatif (Kuznetsov et al., 1996). Dans les cardiomyocytes fantômes, dépourvus de myosine, les mitochondries sont localisées régulièrement entre les myofibrilles (Kay et al., 1997).

Une modification du cytosquelette de la cellule cardiaque par la suppression de l'expression du gène de la desmine change la localisation mitochondriale dans les cellules cardiaques et induit deux populations différentes de mitochondries avec des K_m apparent pour l'ADP différents (augmentation de l'affinité pour l'ADP pour une partie des mitochondries) (Kay et al., 1997 ; Milner et al., 2000).

Par ailleurs, le principal résultat de l'étude de Kaasik et ses collaborateurs en 2003 sur des souris déficientes en CK, a révélé un remodelage du cytosquelette dans le muscle gastrocnémien se traduisant par une augmentation de la quantité de mitochondries près des myofibrilles. Ceci se traduit également par des modifications des interactions des mitochondries avec les organelles subcellulaires pour venir en aide à la fonction contractile et à l'homéostasie du calcium (Kaasik et al., 2003).

Ces résultats soulignent l'importance de la canalisation et de la compartimentation locale de l'énergie dans les cellules musculaires.

Le but de ce travail a été de caractériser quantitativement l'arrangement des mitochondries dans le coeur et les muscles squelettiques. Pour ce faire, nous avons étudié des images de microscopie confocale de mitochondries de cardiomyocytes non fixés et de fibres de soléaire et de gastrocnémien blanc de rat adulte. L'arrangement des mitochondries intermyofibrillaires a été analysé en estimant les densités de distribution des centres relatifs des mitochondries les uns par rapport aux autres (fonction de densité de probabilité). Selon ces fonctions de densité de probabilité, les mitochondries sont arrangées de manière très régulière dans tous les muscles étudiés. Dans les cardiomyocytes (1820 centres de mitochondries marqués), les mitochondries voisines sont alignées le long de rectangles, avec une distance entre les centres de $1.97 \pm 0.43 \mu\text{m}$ et de $1.43 \pm 0.43 \mu\text{m}$ dans les directions longitudinales et transversales, respectivement. Dans le soléaire (1659 centres de mitochondries marqués) et le gastrocnémien blanc (621 paires de mitochondries marquées), la distribution relative des centres de mitochondries est plus complexe. Dans le soléaire et le gastrocnémien blanc les mitochondries sont principalement organisées en paires au niveau des bandes I, et, à cause d'une telle organisation il y a deux distances caractérisant la distribution des mitochondries dans la direction longitudinale dans ces muscles. La distance entre les centres des mitochondriaux dans la direction longitudinale pour la même bande I est de $0.91 \pm 0.11 \mu\text{m}$ et de $0.61 \pm 0.07 \mu\text{m}$ dans le soléaire et le gastrocnémien blanc, respectivement. La deuxième distance décrivant l'arrangement mitochondrial dans la direction longitudinale – la distance entre les centres mitochondriaux de bandes I différentes – est d'environ $3.7 \mu\text{m}$ dans le soléaire et d'environ $3.3 \mu\text{m}$ dans le gastrocnémien blanc. Dans la direction transversale, les mitochondries sont considérablement proches les unes des autres dans le soléaire (plus que dans le gastrocnémien blanc) – la distance est égale à $0.75 \pm 0.22 \mu\text{m}$ dans le soléaire et de $1.09 \pm 0.41 \mu\text{m}$ dans le gastrocnémien. Nos résultats montrent que les mitochondries, qui sont situées entre les myofibrilles, sont arrangées de manière hautement ordonnée à la manière d'un cristal muscle spécifique avec de relativement petites déviations dans les distances entre mitochondries voisines. Ceci va dans le sens du concept de nature unitaire de l'organisation du métabolisme énergétique du muscle.

Cette observation va dans le sens de la proposition émise par Duchen en 1999 (Duchen, 1999) que les mitochondries et le RS puissent être intimement associés en une unité fonctionnelle. Le concept d'unités énergétiques intracellulaires (ICEUs) proposé par Seppet et Saks en 2001 décrit justement l'organisation fonctionnelle de l'énergétique des cellules en

raison de la position fixée avec précision des mitochondries (Seppet et al., 2001; Saks et al., 2001).

Enfin, dans le cas d'une structure proche de celle d'un cristal, il est difficilement envisageable que des phénomènes de fusion et de fission mitochondriales puissent se produire. En effet, sous la contrainte des structures cytoplasmiques, et notamment des protéines du cytosquelette, la position des mitochondries dans les cellules est fixée et ces organelles ne sont pas libres de se déplacer dans les cellules. En revanche, il est probable que ces phénomènes de fusion et de fission mitochondriales puissent être des mécanismes de contrôle de la position des mitochondries et par conséquent de la fonction mitochondriale. Ainsi, des rats obèses ont montré qu'une répression du gène codant pour la mitofusine 2 (Mfn2) s'accompagne d'une altération de la capacité oxydative musculaire (Bach et al., 2003). Ces auteurs ont mis en évidence un rôle majeur de Mfn2 dans la thermogenèse et le métabolisme énergétique mitochondrial qui, lorsqu'il est dérégulé peut être un facteur de risque dans le développement de l'obésité.

Ma contribution dans ce travail est de 50% (préparation du matériel biologique, protocoles de marquages des cellules et des fibres perméabilisées ainsi que leur visualisation au confocal, participation à l'écriture de l'article).

2. Etude in situ et in silico de l'hétérogénéité de diffusion de l'ADP et de la respiration mitochondriale dans les cellules perméabilisées.

La régulation de la respiration mitochondriale dans le cœur intact diffère de celle des mitochondries isolées. En effet, dans les fibres cardiaques perméabilisées à la saponine, les mitochondries *in situ* ont une affinité apparente pour l'ADP plus basse que les mitochondries isolées.

L'observation expérimentale montre des valeurs élevées du K_m apparent dans les cardiomyocytes perméabilisés (Kummel, 1988; Saks et al., 1991; Kay et al., 1997) et également dans les fibres myocardiques perméabilisées (Saks et al., 1993; Anflous et al., 2001; Liobikas et al., 2001; Boudina et al., 2002) avec une distance maximale de diffusion de 8-10 μm (diamètre 15-20 μm), où aucun gradient de concentration d'ADP entre le milieu et le noyau des cellules ne s'est formé (Saks et al., 2001). D'ailleurs, les résultats expérimentaux montrent la même valeur élevée du K_m apparent pour les cardiomyocytes fantômes où l'activité de la MgATPase est diminuée par un facteur 5 par l'extraction sélective de la myosine (Saks et al., 1993; Kay et al., 1997) et d'autre part, le K_m apparent pour l'ADP exogène est très bas (8-15 μM) dans les fibres de muscle squelettique à contraction rapide avec un grand diamètre (50-80 μm) pour une $p\text{Ca}$ de 7 (Kuznetsov et al., 1996; Burelle et Hochachka., 2002). Ces résultats prouvent clairement que le K_m apparent pour l'ADP exogène est indépendant de la distance de diffusion de l'ADP dans la phase aqueuse, et est lié aux structures et aux processus intracellulaires (Seppet et al., 2004).

L'hétérogénéité de la diffusion de l'ADP et la régulation de la respiration ont été étudiées dans des cardiomyocytes perméabilisés et des fibres cardiaques *in situ* et *in silico*. L'arrangement régulier des mitochondries dans les cellules a été altéré par un court traitement protéolytique à la trypsine et visualisé par microscopie confocale. Le système pyruvate kinase (PK) – phosphoénolpyruvate (PEP) a été utilisé pour piéger l'ADP généré par les réactions des Ca,MgATPases. L'inhibition de la respiration par le système PEP-PK a augmenté de 2-3 fois après la désorganisation de des mitochondries dans les cellules. L'ADP produit localement par la réaction de la créatine kinase n'était pas accessible au système PEP-PK dans les fibres perméabilisées intactes, mais une partie a été libérée après protéolyse ménagée à cause d'une plus grande perméabilité de la membrane mitochondriale externe. Dans les études *in silico*, nous montrons par le modèle mathématique que les résultats peuvent être expliqués par la diffusion hétérogène de l'ADP à cause des restrictions de diffusion au niveau de la

MME et de son voisinage, qui sont changées après traitement à la trypsine. Les restrictions localisées et la diffusion hétérogène de l'ADP démontrent l'importance des complexes fonctionnels des mitochondries avec le réticulum sarcoplasmique et les structures myofibrillaires et de la créatine kinase dans la régulation de la phosphorylation oxydative.

Le traitement à la trypsine ne change pas les paramètres de respiration des mitochondries isolées, mais entraîne une diminution de 5 fois du K_m apparent pour l'ADP dans les fibres perméabilisées. L'organisation des cellules est perdue par protéolyse sélective de certaines protéines du cytosquelette et le K_m apparent pour l'ADP diminue. Pour diminuer significativement le K_m apparent pour l'ADP exogène, il faut soit créer un choc hyposmotique qui rompt la MME soit réaliser un traitement protéolytique (Saks et al. 2003).

Pour analyser les problèmes de restriction de diffusion dans certaines régions à l'intérieur de la cellule, en premier lieu le coefficient de diffusion pour les métabolites dans les fibres contrôles (D^{app}) a été choisi comme égal à la valeur dans la phase cytosolique des cellules (D_0 , $DF=1$), alors que la perméabilité de la membrane externe mitochondriale pour l'ADP (exprimée comme PF) a été pris comme variable, selon notre hypothèse initiale (Saks et al., 1995). La comparaison de ces résultats avec les données expérimentales de la dépendance de la respiration pour l'ADP exogène a montré selon ces conditions, l'augmentation de la perméabilité de la membrane externe pour l'ADP augmente l'affinité du système pour l'ADP, comme cela était attendu, approchant les valeurs expérimentales des mitochondries isolées *in vitro*. La valeur $DF=1$ n'explique pas l'effet de la trypsine sur l'inhibition compétitive du système PEP/PK, il doit donc exister d'autres restrictions supplémentaires de la diffusion de l'ADP en dehors de la membrane externe mitochondriale, par exemple entre les différentes unités fonctionnelles. On cherche alors les valeurs optimales de DF et PF simultanément pour un meilleur ajustement. Les valeurs optimales de DF sont situées entre 0.02 et 1 et PF entre 0.02 et 0.08. Ceci signifie que le coefficient moyen apparent de diffusion pour l'ADP peut être diminué de un ou deux ordres de magnitude quelque part entre les complexes fonctionnels (ICEUs) et le milieu, et la perméabilité de la membrane externe mitochondriale pour l'ADP peut aussi diminuée en comparaison avec celle des mitochondries isolées.

L'efficacité du système PEP/PK en compétition avec les mitochondries pour l'ADP endogène dépend de la vitesse de diffusion de l'ADP endogène dans les fibres entre les Ca,MgATPases et les mitochondries, et entre les Ca,MgATPases et la solution. Pour les fibres non traitées, un bon ajustement entre les valeurs calculées et expérimentales donne des valeurs de DF inférieures à 0.06, le meilleur ajustement étant pour $DF= 0.02$. Quand le

coefficient de diffusion pour l'ADP était celui de la phase cytosolique ($DF=1$), l'effet calculé du système PK était très important et les courbes théoriques très éloignées des points expérimentaux pour des fibres intactes. Après traitement à la trypsine, lorsque la structure du muscle est désorganisée, en présence de PK un bon ajustement a été trouvé pour $DF=2$: la courbe théorique se trouvant dans les barres d'erreurs expérimentales. Quelques restrictions de diffusion pourraient toutefois être encore présentes, cependant les moyennes des valeurs expérimentales sont un peu au-dessus pour des activités de PK inférieures à la courbe théorique.

Une information importante sur la distribution des restrictions de diffusion dans les cellules cardiaques perméabilisées peut être obtenue à partir de la stimulation de la respiration par 20 mM de Cr en présence du système PEP/PK. Dans tous les cas, l'effet stimulant de la créatine sur la respiration en présence du puissant système piège d'ADP PEP/PK est reproductible par le modèle et le degré de stimulation dépend remarquablement des valeurs de PF pour la membrane externe mitochondriale. Pour les fibres intactes, la vitesse de respiration en présence de créatine calculée a toujours été dans la gamme d'erreurs expérimentales avec une légère diminution de la VO_2 lorsque DF augmente.

L'influence de DF et PF sur la vitesse de respiration stimulée par la créatine a été également analysée quantitativement. Les vitesses simulées excèdent toujours les vitesses initiales et la diminution de DF conduit à une augmentation de PF et vice versa. Après traitement à la trypsine, lorsque $DF=2$, le seul paramètre important est PF, de bons ajustements avec les valeurs expérimentales ont été observés pour PF supérieur à 5. Ceci signifie que le traitement à la trypsine résulte dans une augmentation significative de la perméabilité de la membrane externe mitochondriale.

Enfin, la dépendance de la VO_2 pour la concentration en ADP exogène a été simulée après le traitement protéolytique des fibres. Les valeurs observées couramment pour le K_m apparent autour de 300-500 μM correspondent à $DF=0.06$ et à la valeur correspondante de $PF=0.03$. Quand la structure de la cellule est désorganisée par la trypsine et que $DF=2$, l'augmentation de PF aboutit à une diminution rapide du K_m apparent pour l'ADP exogène. Dans ce cas, les valeurs expérimentales du K_m apparent pour l'ADP exogène se situent entre 40 et 70 μM correspondant à des valeurs de $PF > 0.5-1$.

On peut diminuer les valeurs de PF dans les cellules perméabilisées *in situ* jusqu'à deux ordres de magnitude, et celui de DF d'un ordre de magnitude en comparaison avec des mitochondries *in vitro*.

Les résultats ont montré que les données expérimentales de cette étude et des précédentes peuvent être expliquées par l'hétérogénéité de la diffusion des métabolites phosphorylés découverte par Kinsey et de Graaf (Kinsey et al., 1999; de Graaf et al., 2000). Le dépendance expérimentale de la VO_2 pour l'ADP exogène (et l'ATP), le K_m apparent pour ces substrats, les altérations de l'affinité apparente pour l'ADP exogène par la trypsine et les changements et la canalisation métabolique de l'ADP par ce traitement protéolytique; tout ceci pourrait être expliqué par des variations de la constante apparente de diffusion D^{app} , et de la perméabilité de la MME, et donc par des altérations de la diffusion hétérogène de la diffusion intracellulaire de l'ADP (et de l'ATP).

En conclusion, le modèle mathématique modifié du transfert d'énergie compartimentalisé a été adapté dans ce travail pour étudier la diffusion de l'ADP exogène et endogène dans les fibres cardiaques avant et après désorganisation de la structure des ICEUs. Une analyse quantitative des données expérimentales par le modèle mathématique du transfert d'énergie compartimentalisé a montré que la diffusion de l'ADP dans les cellules est hétérogène et que le coefficient de diffusion peut être diminué localement de plus d'un ordre de magnitude. Ceci se produit en plus de la restriction de la perméabilité de la MME pour l'ADP dans la cellule *in vivo*. L'analyse quantitative de ces données par le modèle du transfert d'énergie compartimentalisé a confirmé que la perméabilité de la MME est restreinte dans les cellules *in situ* et augmentée après traitement protéolytique. Dans ces systèmes, structurellement et fonctionnellement organisés, le rôle central de la régulation de la respiration mitochondriale appartient aux réseaux de CK et d'AK (Dzeja et al., 1998; Saks et al., 1998a). Ce phénomène est clairement tissu-spécifique, il ne dépend pas de la taille des cellules et ne peut pas être expliqué trivialement par l'existence de longues distances de diffusion dans les fibres (Kay et al., 1997 ; Seppet et al., 2004).

La modélisation des effets de la Cr sur la respiration stimulée par l'ADP endogène en présence du système piège PEP-PK supporte à la fois la conclusion d'un rôle central de la MiCK dans la régulation de la respiration et l'importance des changements de la perméabilité de la membrane externe pour les nucléotides adényliques après traitement protéolytique des fibres à la trypsine.

Ma contribution dans ce travail se monte à 30% (préparation des échantillons biologiques, oxygraphie et spectrophotométrie)

3. Etude de la régulation de la fonction mitochondriale et de la stabilité métabolique : analyse du couplage fonctionnel ANT-MiCK

L'étude précédente a montré qu'il existe 2 niveaux de restriction de diffusion de l'ADP : un premier au niveau de la membrane externe mitochondriale (décrit par PF) mais également un deuxième au niveau de restrictions de diffusion de l'ADP (décrit par D^{app}) dans les cellules cardiaques. Suite à ce travail, Vendelin et ses collègues ont confirmé l'existence de restrictions de diffusion et ont analysé les 2 principaux modes de distribution de la restriction des nucléotides adényliques : la restriction de diffusion uniforme et la limitation de diffusion localisée au voisinage des mitochondries en ajustant le modèle mathématique sur les données expérimentales. Ainsi ils ont pu conclure de leurs résultats que les restrictions de diffusion intracellulaires des nucléotides adényliques ne sont pas distribuées uniformément mais sont plutôt localisées dans certains compartiments des cellules cardiaques (Vendelin et al., 2004a).

Une question se pose alors : quelles sont les conséquences de ce phénomène d'hétérogénéité de la diffusion de l'ADP (et de l'ATP) sur le plan du métabolisme énergétique musculaire ?

Nous avons déjà constaté que cela pouvait expliquer la valeur élevée du K_m apparent pour l'ADP exogène mais qu'en est-il du rôle majeur du couplage fonctionnel ANT-MiCK dans la régulation de la phosphorylation oxydative ?

Les théories de contrôle métabolique décrivent le contrôle des flux énergétiques quantitativement par les coefficients de contrôle de flux. L'un des théorèmes fondamentaux de ces théories postule que, dans le cas d'un système homogène, la somme des coefficients de contrôle est de un (Westerhoff et Van Dam., 1987). Kholodenko et ses collègues ont développé plus profondément cette théorie, montrant dans le système de canalisation métabolique, que la somme des coefficients de contrôle des flux dépasse significativement un (Kholodenko et al., 1993a, b, c ; Kholodenko et al., 1995) et que de tels systèmes sont contrôlés de manière plus efficace que de simples systèmes métaboliques homogènes. Dans les systèmes complètement couplés, la somme des coefficients de contrôle des flux pourrait avoir une valeur supérieure à 8 (Saks et al., 1996) très différents des coefficients de flux des systèmes homogènes.

Concernant la problématique de la régulation de la respiration mitochondriale *in vivo*, 2 camps confrontent leurs théories.

- Le premier mené par Balaban propose la théorie de l'activation parallèle par le calcium.

Une hypothèse de contrôle du métabolisme a émergé lors de la découverte de l'activation des deshydrogénases de la matrice mitochondriale par le Ca^{2+} (McCormack et Denton., 1984; McCormack et al., 1990). Selon cette hypothèse, l'augmentation de la charge de travail cardiaque s'accompagne d'une élévation du Ca^{2+} cytosolique, et d'un effet du Ca^{2+} matriciel sur le cycle de Krebs qui va alors accroître la production d'équivalents réduits (NADH , FADH_2) et le flux d'électrons à travers la chaîne respiratoire, augmentant de ce fait la production d'ATP en générant une plus grande force proton motrice. Cependant, il a été discuté que l'activation des deshydrogénases par le Ca^{2+} ne compterait pas quantitativement dans les changements des vitesses de synthèse d'ATP (Harris et Das, 1991). Donc, un (ou des) mécanisme(s) additionnel(s) incluant une activation directe de l'ATP synthase par le Ca^{2+} (Territo et al., 2000), ont été évoqué(s) pour expliquer l'accélération de la production d'ATP (Heineman et Balaban., 1990). De nombreux problèmes restent obscurs dans l'hypothèse de l'activation parallèle par le Ca^{2+} : le manque de mécanismes spécifiques du transport mitochondrial de Ca^{2+} et la régulation de la F0-F1-ATPase, la dépendance de l'activation des ATPases cytosoliques du Ca^{2+} ainsi que celle de la phosphorylation oxydative en fonction du temps, et enfin le rôle de la compartimentation cytosolique. De plus, le manque de mesures de la $[\text{Ca}^{2+}]$ cytosolique et mitochondriale est problématique en conditions *in vivo*. Ainsi, en 2002, Balaban, propose un modèle de contrôle du métabolisme énergétique cardiaque incluant une activation parallèle par le Ca^{2+} avec des composantes plus 'classiques' telles que la rétroaction métabolique et la compartimentation cytosolique (Balaban, 2002).

- Le deuxième, dans lequel nous nous plaçons, penche pour le mécanisme de rétroaction métabolique grâce à la canalisation métabolique *via* les systèmes de transfert d'énergie.

Dans un premier travail nous analysons les concepts et les données expérimentales des mécanismes de régulation du métabolisme oxydatif dans les cellules musculaires. L'énergétique musculaire est basée sur la relation force-longueur qui, dans le cœur entier, est exprimée par la loi de Frank-Starling. Cette loi stipule que les altérations de volume diastolique du ventricule gauche changent linéairement avec le travail cardiaque et la consommation d'oxygène. La seconde caractéristique du cœur est la stabilité métabolique – des niveaux quasiment constants de phosphates riches en énergie, ATP et phosphocréatine, qui sont pratiquement indépendants de la charge de travail et de la consommation d'oxygène, contrairement au muscle rapide qui n'a pas de stabilité métabolique et se fatigue rapidement. L'analyse de la littérature montre qu'une augmentation d'un ordre de magnitude de la

consommation d'oxygène, à cause de la loi de Frank-Starling, est observée sans changement significatif des flux intracellulaires de calcium. Donc, l'activation parallèle de la contraction et de la respiration mitochondriale par les ions calcium pourrait jouer un rôle mineur dans la régulation de la respiration des cellules. La régulation effective de la respiration sous l'effet de la loi de Frank-Starling et de la stabilité métabolique du cœur est expliquée par les mécanismes de couplage fonctionnel au sein de complexes 'supramoléculaires' dans les mitochondries, et à un niveau subcellulaire au sein des unités énergétiques intracellulaires (ICEUs). Une telle organisation complexe, structurale et fonctionnelle, du métabolisme cardiaque peut être décrit quantitativement par des modèles mathématiques.

Dans un deuxième travail, nous analysons les données existantes sur les mécanismes cellulaires du fonctionnement des créatine kinases et leur rôle dans la régulation de la respiration mitochondriale des cellules musculaires. Quelques conclusions générales peuvent être tirées à partir de nombreuses données expérimentales. Les créatine kinases couplées de manière fonctionnelle semblent jouer le rôle intelligent du 'démon de Maxwell' dans la cellule, en déplaçant sélectivement l'équilibre de réaction de la créatine kinase dans différentes directions dans les différents compartiments de la cellule pour assurer un fonctionnement effectif des réseaux de transfert d'énergie. Ce mécanisme de régulation métabolique explique la large gamme de valeurs de vitesse de respiration pour des niveaux constants de phosphates de haute énergie dans le cœur travaillant – le phénomène de stabilité métabolique- sous les conditions physiologiques de régulation de la fonction cardiaque selon le mécanisme de Frank-Starling. Les nouvelles approches méthodologiques – modélisation mathématique combinée soigneusement avec l'analyse expérimentale de données sur la régulation de la respiration dans les cellules musculaires- sont analysées et utilisées pour une description quantitative des restrictions de diffusion intracellulaires de l'ADP et de l'ATP et le signal métabolique des créatine kinases. On a considéré les

conséquences physiologiques des changements de ce système de signal intracellulaire.

Du point de vue de la réaction de la CK dans la théorie de l'activation parallèle par les ions calcium, on considère qu'elle est en rapide équilibre et qu'alors une concentration cytoplasmique élevée en ADP est maintenue, saturant pratiquement l'ANT. La réaction de la CK ne servirait simplement qu'à préparer la mitochondrie pour une régulation par les ions calcium. Plusieurs arguments montrent que le mécanisme alternatif d'une activation parallèle de la contraction et des enzymes mitochondriales par le calcium proposé par Balaban (Korzeniewski, 1998 ; Balaban, 2002) peut avoir un rôle mineur dans la régulation de la fonction mitochondriale dans le cœur en conditions physiologiques, quand le travail cardiaque et la respiration mitochondriale sont régulés par la loi de Frank-Starling. Starling et Visscher ont prouvé que l'augmentation du volume diastolique du ventricule gauche a comme conséquence l'augmentation linéaire du travail cardiaque et de la consommation d'oxygène (Starling et Visscher., 1927). Ces résultats ont été par la suite reproduits par Neely (Neely et al., 1967) et Williamson (Williamson et al., 1976) sur des cœurs travaillant isolés de rat. Il a été montré sur ce modèle que l'augmentation du taux de remplissage du ventricule gauche peut augmenter fortement le taux de consommation l'oxygène sans changements cruciaux des niveaux d'ATP et de PCr (Williamson et al., 1976). Ceci décrit le phénomène de stabilité métabolique, second principe fondamental de l'énergétique cardiaque après la loi de Frank-Starling. La théorie de l'équilibre de la réaction de la CK n'explique pas ces observations car dans ce cas, la stabilité métabolique représente des niveaux stables et relativement élevés d'ADP cytoplasmiques en comparaison avec l'affinité de l'ANT pour ce substrat, ce qui pourrait donc déjà activer la respiration au repos. Ces théories prédisent qu'au repos il y a une faible concentration en calcium libre dans le cytoplasme et qu'une augmentation du travail devrait augmenter la concentration de Ca^{2+} , après l'entrée de ces ions dans la mitochondrie, activant la respiration par l'intermédiaire de deshydrogénases mitochondriales du cycle de Krebs sensibles au Ca^{2+} . Ainsi, si ce mécanisme de régulation est le principal, la concentration de calcium autour des mitochondries devrait augmenter linéairement avec l'augmentation du travail. L'utilisation des sondes de calcium n'a montré aucun changement dans les mouvements transitoires calciques cytoplasmiques dans ces conditions (Kentish et Wrzosek., 1998; Shimizu et al, 2002). De plus, il a été montré par le groupe de Balaban (Territo et al., 2001) qu'à une concentration de 600 nM de calcium, la vitesse de respiration était maximale et que l'état 4 était augmenté d'un facteur de 2. Sachant que la concentration de calcium cytoplasmique peut s'étendre jusqu'à 1-3 μ M, aucun effet du calcium sur la respiration ne

peut être espéré dans ces conditions puisque le système de respiration mitochondrial est déjà saturé à 600 nM de calcium libre. Par ailleurs, l'inhibition du relargage de calcium du RS a diminué les mouvements transitoires calciques et la force contractile, mais n'a pas changé le rapport force-longueur (Kentish et Wrzosek., 1998). En effet, l'activation adrénérgique du cycle du calcium discutée par Balaban décale seulement la courbe de Frank-Starling vers le haut (inotropie positive), mais ne change pas le phénomène décrit basé sur le rapport force-longueur des sarcomères. Starling et Visscher avait déjà compris ce phénomène en 1927 en écrivant que « l'adrénaline augmente la consommation d'oxygène à une longueur donnée de fibre, sans cependant, altérer la correspondance générale entre les changements dans le volume diastolique et la consommation d'oxygène » (Starling et Visscher., 1927). L'augmentation du volume du ventricule gauche augmente la consommation en ATP et la production d'ADP puis de la Cr (Ventura-Clapier et al., 1994) dans les myofibrilles et augmente ainsi simplement la signalisation métabolique par rétroaction.

Ainsi, le mécanisme physiologique de la régulation de l'énergétique cardiaque n'implique pas une augmentation des flux de calcium durant l'accroissement de la charge de travail, comme prédit par les théories de l'activation parallèle et l'équilibre de la créatine kinase. La régulation de la respiration mitochondriale dans les cellules cardiaques en conditions physiologiques ne peut être expliquée principalement par la théorie proposée (Balaban, 2002).

Nous devons donc chercher des mécanismes alternatifs où les réactions des CK ne sont pas en équilibre dans les cellules musculaires *in vivo*. Ceci nous amène à envisager le phénomène de couplage fonctionnel et un concept plus général de la science : le concept du 'démon de Maxwell'. Ce concept de James Clerk Maxwell date de 1871 lorsqu'il a analysé la seconde loi de thermodynamique. Dans un état d'équilibre thermodynamique de tous les paramètres du système (température et pression constantes) aucun travail n'est possible. Ceci est dû à la moyenne constante des valeurs des vitesses de mouvement des particules à cause de leur distribution selon la fonction de Boltzmann. Maxwell propose la situation suivante :

Considérons un système homogène, séparé en deux par un trou qui peut être ouvert ou fermé par une forme d'intelligence : le 'démon de Maxwell'. Ce trou est ouvert si la vitesse de mouvement de la particule est supérieure à la moyenne des vitesses des particules sinon il est fermé. Ceci engendre un déséquilibre et le 'démon de Maxwell' crée une différence de température entre les deux parties du système rendant ainsi possible un travail sans avoir recours à de l'énergie extérieure. Une réaction d'équilibre est toujours dynamique, les réactions directes et inverses se produisent à la même vitesse mais la vitesse nette de la

réaction est nulle. Les multiples composants d'un système enzymatique laisse au 'démon de Maxwell' plus de choix. En effet, on peut considérer que chaque molécule d'enzyme possède un 'démon' qui lui est propre (se situant près d'elle pour mieux la contrôler). L'intelligence du 'démon de Maxwell' est donc d'éviter l'augmentation non nécessaire de l'entropie en contrôlant l'accès direct du substrat vers l'enzyme et en enlevant le produit formé.

On a donné le nom de couplage fonctionnel à ces mécanismes moléculaires 'démoniaques' correspondant à une canalisation métabolique dans un microcompartiment.

Dans le cas de systèmes de transfert d'énergie compartimentalisés, tels que les systèmes de CK, ce principe est facilement réalisé. Dans ce modèle (retrouvé dans les cellules de muscles cardiaque et oxydatifs), les isoenzymes de CK sont liées de manière structurale aux systèmes de production, de transfert et de consommation d'ATP pour permettre leur interaction avec ces systèmes. Sur la base d'études structurales et fonctionnelles il a été conclu que dans les cellules cardiaques, les mitochondries sont organisées en complexes fonctionnels avec le RS et les sarcomères. Cette organisation à un niveau subcellulaire est appelée : unité énergétique intracellulaire ou ICEU (Saks et al., 2001).

Plus précisément, dans le cas du couplage fonctionnel ANT-MiCK : le transport coordonné de l'ATP et de l'ADP par l'ANT en changeant les conformations de ce transporteur est le mécanisme du 'démon de Maxwell' qui contrôle le fonctionnement de la MiCK. Ce mécanisme de contrôle a été récemment décrit de manière quantitative par Vendelin et al. (Vendelin et al., 2004b) en étudiant : 1. la compartimentation dynamique de l'ATP et de l'ADP, en prenant en compte les concentrations de substrats entre l'espace intermembranaire et la solution environnante (à cause de restrictions de diffusion) ; 2. le transfert direct des substrats entre la MiCK et l'ANT. Selon l'analyse des modèles mathématiques, l'hypothèse de la compartimentation dynamique n'est pas suffisante pour reproduire les valeurs expérimentales des constantes de dissociation de la MiCK couplée à la phosphorylation oxydative. A la fois, les données structurales et fonctionnelles montrent de manière convaincante que la phosphorylation oxydative contrôle, comme un 'démon de Maxwell', *via* la réaction ANT-MiCK pour la forcer à produire de la phosphocréatine en dépit de conditions thermodynamiques et cinétiques non favorables. Dans le même temps, la MiCK joue le même rôle pour l'ANT et la phosphorylation oxydative en canalisant l'ADP en contrôlant directement la vitesse de respiration.

Dans les mitochondries isolées de cœur, l'activité maximale de la MiCK en direction de la production de PCr est exactement égale à la vitesse maximale de la synthèse d'ATP par la phosphorylation oxydative (près de $1\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ à 30°C) (Saks et al., 1975 ; Jacobus et

Saks., 1982). Il n'y a pas cependant aucune capacité excessive de la MiCK comme Balaban (Balaban, 2002) et Korzeniewski (Korzeniewski et Zoladz., 2001) ont pu le prétendre à cause de la localisation très précise de la MiCK par rapport à l'ANT, l'ATP est directement canalisé par l'ANT de la matrice vers un microcompartiment (« gap ») entre ces protéines (Saks et al., 1975; Barbour et al., 1984; Jacobus et Saks., 1982; Saks et al., 1985) saturant rapidement le site actif de la MiCK. Le rapport local ATP/ADP disponible pour la MiCK dans ce « gap » entre l'ANT et la MiCK est toujours plus élevé que celui dans le milieu et donc pousse, à la fois d'un point de vue thermodynamique et cinétique, la réaction MiCK dans le sens de la synthèse de PCr (Saks et al., 1975 ; Barbour et al., 1984, Jacobus et Saks, 1982 ; Saks et al., 1985). La canalisation de l'ATP et de l'ADP dans ce microcompartiment et leur turnover entre la MiCK, l'ANT et la phosphorylation oxydative représentent le mécanisme de couplage fonctionnel entre ces systèmes et la base de la stabilité métabolique du cœur (Saks et al., 1975; Jacobus et Saks., 1982; Saks et al., 1985; Saks et al., 1994). L'importance du couplage fonctionnel ANT-MiCK pour la stabilité métabolique du cœur a été récemment vérifiée par Spindler (Spindler et al., 2002) dans une étude sur cœurs transgéniques isolés perfusés. Ces cœurs étaient déficients en isoforme sarcomérique de la créatine kinase mitochondriale (sMiCK) : dans ces cœurs, le rapport PCr/ATP était considérablement diminué.

Toutes les données actuelles de la littérature sont en faveur de la théorie d'un mécanisme de rétroaction métabolique de la régulation de la respiration mitochondriale *in vivo*. Le mécanisme central est le couplage fonctionnel de différentes enzymes et transporteurs, augmentant le turnover des nucléotides adényliques en amplifiant donc le signal métabolique venant du cytoplasme. Le couplage fonctionnel ANT-MiCK explique le phénomène le plus important de la physiologie cardiaque et du métabolisme énergétique : la dépendance linéaire de la consommation d'oxygène en fonction du travail régulée par le mécanisme de Frank-Starling en conditions de stabilité métabolique.

Ma contribution dans ce travail est de 30% (analyse de la littérature et participation à la discussion).

4. Etude du rôle potentiel de la tubuline, du réseau microtubulaire et de la protéine STOP dans l'organisation intracellulaire des mitochondries et dans la régulation de la fonction mitochondriale dans les cellules musculaires striées.

L'origine des différences significatives des cinétiques de régulation de la respiration mitochondriale dans les cellules cardiaques *in vivo* et *in vitro* est analysée. Toutes les données expérimentales montrent l'importance des facteurs structuraux dans l'arrangement intracellulaire des mitochondries au sein des ICEUs et également dans la perméabilité de la MME. Le réseau du cytosquelette est important pour l'arrangement mitochondrial et la régulation de la phosphorylation oxydative des cellules musculaires *in situ*. En effet, un choc hypotonique, en rompant la MME, diminue le Km apparent pour l'ADP exogène (le même effet est observé dans l'ischémie chronique). Ceci montre que l'intégrité de la MME est impliquée dans ce phénomène. Cette différence est tissu-spécifique et observée dans les muscles lents mais pas dans les muscles rapides. Ainsi, afin d'identifier la ou les protéines appartenant au cytosquelette et régulant les mitochondries, une électrophorèse bidimensionnelle a été réalisée par Saks et ses collaborateurs (Saks et al., 2001). Cette dernière indique un groupe d'au moins sept protéines dans les fibres cardiaques perméabilisées de faible masse moléculaire sensibles à la trypsine et non présentes dans les fibres glycolytiques, qui ont un Km apparent pour l'ADP exogène plutôt bas. Par ailleurs, Appaix et al., ont montré l'effondrement du réseau de microtubules après traitement protéolytique à la trypsine qui coïncide avec une désorganisation de l'arrangement régulier des mitochondries et une augmentation très significative de l'affinité des mitochondries pour l'ADP exogène (Appaix et al., 2003) en raison de l'élimination des barrières locales de restriction de diffusion.

Dans certains cas, le mouvement des microtubules est dû à des protéines 'moteurs' de type kinésine ou dynéine cytoplasmiques, qui lient les microtubules et l'énergie chimique (ATP) dans ce travail mécanique du mouvement des mitochondries le long des MT (Yaffe, 1999). On peut penser que les mitochondries, dans les cellules cardiaques, sont arrivées à la position appropriée et fixe à l'intérieur des complexes fonctionnels pour réaliser le plus efficacement possible la régulation de l'énergétique cellulaire. En effet, pendant le développement du muscle cardiaque, la distribution des mitochondries change, passant d'un arrangement chaotique lors de la période postnatale à un arrangement très régulier dans le muscle adulte (Tiivel et al., 2000).

Nous avons donc voulu connaître par cette étude quel était l'effet de la tubuline, des microtubules et d'une MAP : la protéine STOP (stabilisateur des MT à basse température) sur la régulation de la fonction mitochondriale dans les cellules musculaires.

Les mécanismes d'interactions des mitochondries avec les protéines du cytosquelette dans le cœur et les muscles squelettiques sont d'un grand intérêt de cette étude. Nos précédentes études (Kuznetsov, 1996; Voloshchuk, 1998) ont démontré une faible affinité de la respiration mitochondriale pour l'ADP exogène dans les muscles oxydatifs (myocarde, soléaire) versus muscles glycolytiques (*extensor digitorum longus*, EDL, *vastus lateralis*, VE). Une protéolyse sélective entraîne l'augmentation de l'affinité des mitochondries pour l'ADP dans les muscles oxydatifs mais n'a aucun effet sur les muscles glycolytiques (Kuznetsov, 1996; Voloshchuk, 1998). Après traitement à la colchicine (10 μ M, 2h, 4°C), le réseau de MT est détruit mais la tubuline est toujours présente dans les cellules cardiaques. De plus, en oxygraphie, on voit apparaître deux populations de mitochondries dont l'une d'elles seulement voit son affinité apparente pour l'ADP augmenter significativement. L'hypothèse selon laquelle les deux muscles oxydatifs, myocarde et soléaire, expriment probablement des protéines capables d'exercer un contrôle intracellulaire sur la respiration mitochondriale tandis que les muscles glycolytiques n'ont pas ces protéines, a été émise. Pour définir la nature de ces protéines, nous avons isolé les gènes qui sont communs entre les deux types de muscles oxydatifs mais non exprimés dans le muscle glycolytique (VE). Pour évaluer les différences entre muscles au niveau de l'expression des gènes, nous avons isolé les pools totaux d'ARN de tissus de rat d'intérêt de muscle lent oxydatif : le cœur (C) et le soléaire (S) ainsi que le *extensor digitorum longus* (EDL). Ensuite, les pools totaux d'ARN ont été retranscrits en double hélice d'ADN. La technique d'électrophorèse a été utilisée pour l'analyse de l'ADN. Nous avons démontré que dans la souris adulte, le gène de la β -tubuline M-beta-4 est spécifique du type de fibre. Donc, nous avons étudié le rôle possible des

microtubules dans la régulation de la respiration mitochondriale dans les muscles cardiaque et squelettiques par oxygraphie et microscopie confocale. Dans une deuxième étape, l'implication de la protéine STOP, associée aux microtubules, dans l'énergétique cellulaire des muscles a également été étudiée.

Nos résultats d'imagerie confocale montrent que la β -tubuline, à 4°C, est présente dans les cellules cardiaques sous forme polymérisée de réseau microtubulaire dense ce qui est conforme aux résultats d'Appaix et al (Appaix et al., 2003). Les MT semblent entourer les mitochondries et les deux marquages ne se superposent qu'en quelques endroits seulement. Dans le soléaire, la β -tubuline est présente sous une organisation différente : elle forme des stries dans le sens transversal de la cellule et son marquage se superpose à celui des mitochondries. Enfin dans l'EDL, on ne retrouve que très peu de cette protéine et essentiellement au niveau subsarcolemmal. Le marquage de la protéine STOP, à 4°C, montre qu'elle est attachée aux MT dans le cœur, ainsi que dans le soléaire alors que sa présence n'a pu être détectée dans le muscle rapide, EDL.

Dans les souris déficientes en protéine STOP, STOP (-/-), la tubuline est toujours présente dans les cellules cardiaques mais sous forme dépolymérisée, son marquage est complètement diffus. Cette observation est la même qu'après un traitement à la colchicine qui détruit le réseau de MT dans les cellules cardiaques. Dans le soléaire, le marquage est également plus dispersé. Enfin, dans l'EDL, le marquage est extrêmement faible. Dans le gastrocnémien blanc, nous avons observé un marquage complètement différent de la tubuline dans deux fibres voisines. Ceci reflète donc la spécificité de la distribution de cette protéine dans les cellules musculaires.

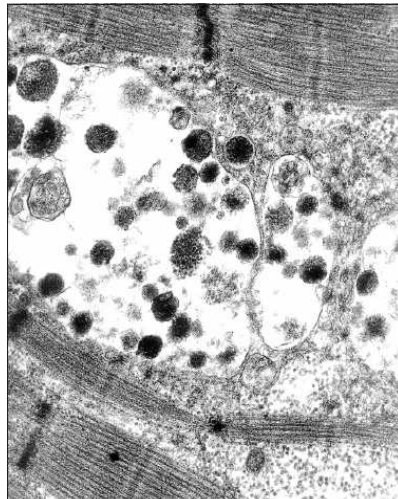
Ainsi, nous avons montré que l'organisation de la tubuline dépend du type de fibre musculaire.

La tubuline libre (non polymérisée) est soluble dans le cytoplasme et, étant donné que nous travaillons sur cellules perméabilisées, la présence de cette protéine nous indique qu'elle est attachée à des structures intracellulaires qu'il reste à identifier.

Par ailleurs, les résultats de l'étude fonctionnelle ont montré que le traitement à la colchicine induit l'apparition d'une population de mitochondries sensibles à ce traitement. Ces données expérimentales semblent cohérentes avec l'existence d'une population de MT résistante à la colchicine. La colchicine est un agent connu pour induire une myopathie chez l'Homme (De Deyn et al., 1995; Choi et al., 1999, Wilbur et Makowsky., 2004). Cette myopathie s'accompagne d'une élévation des niveaux de CK ainsi que d'une désorganisation des myofibrilles dans les muscles et de la présence de vacuoles subsarcolemmales de taille

variable contenant des lysosomes (De Deyn et al., 1995; Choi et al., 1999). Ces observations semblent indiquer que les MT jouent un rôle majeur dans l'énergétique cellulaire des muscles squelettiques en participant à l'organisation structurale des ICEUs.

Image de microscopie électronique de muscle d'un patient souffrant de myopathie induite par la colchicine. Cette image montre des vacuoles cytoplasmiques contenant des corps granulaires et membranaires hétérogènes, du glycogène et des lysosomes (x11820) (d'après Choi et al., 1999).



Ainsi, le traitement à la colchicine ne permet pas d'étudier l'ensemble des mitochondries des cellules musculaires. C'est la raison pour laquelle, nous nous sommes intéressés à l'étude des animaux transgéniques déficients en protéine STOP (qui stabilise les MT lorsqu'ils sont exposés au froid).

Chez les souris STOP (-/-), l'affinité apparente pour l'ADP exogène est fortement augmentée dans le cœur et le soléaire de 30 et 40 %, respectivement. La protéine STOP n'intervient donc qu'indirectement dans la régulation de la phosphorylation oxydative. En revanche, dans les muscles glycolytiques, aucune modification de ce paramètre n'a été détectée. Dans les cellules des muscles oxydatifs, cette augmentation de l'affinité apparente des mitochondries pour l'ADP exogène peut être corrélée avec la désorganisation de la tubuline qui diminuerait les restrictions de diffusion de l'ADP dans le voisinage des mitochondries. En effet, il est aisé de penser que la forme polymérisée de la tubuline en MT puisse créer des contraintes spatiales dans le cytoplasme empêchant ainsi une diffusion homogène des nucléotides adényliques *in vivo*. Néanmoins, la disparition du réseau microtubulaire ne s'accompagne pas d'une diminution du Km apparent aussi forte qu'après un traitement protéolytique par exemple. Ceci s'explique par le fait que l'interaction des

mitochondries avec les MT est indirecte et médiée par le biais de MAP. Ainsi, il a été montré par Linden et Karlsson en 1996 (Linden et Karlsson., 1996) que MAP-2 interagit directement avec le VDAC au niveau de la MME. Il existe également une interaction entre VDAC et la chaîne légère de la dynéine Tctex1 *in vivo* (Schwarzer et al., 2002). De plus, la présence ou l'absence de tubuline est tissu-spécifique et coïncide avec une valeur élevée ou non du Km apparent pour l'ADP exogène dans ces cellules musculaires. On peut envisager que, probablement, seule l'interaction mitochondrie-MAP-tubuline est importante pour la régulation de la perméabilité de la membrane mitochondriale externe sans nécessiter une interaction mitochondrie-MAP-MT. Cette hypothèse peut être appuyée par l'étude de Carré et al., (Carré et al., 2002) qui a constaté, en utilisant la microscopie électronique, la présence de tubuline dans les membranes mitochondriales de mitochondries de cellules humaines cancéreuses ou non. Ces auteurs ont également analysé les différents isotypes de tubuline présentes dans ces membranes. Il résulte que la tubuline mitochondriale est enrichie en α -tubuline acétylée et tyrosinée et en β -tubuline 3 mais qu'elle ne contient que très peu de β -tubuline 4 en comparaison de la tubuline cellulaire. Ces résultats vont également dans le sens que l'isotype de β -tubuline 4 est majoritairement cytoplasmique ce qui rejoint les données de notre étude concernant sa tissu spécificité. La tubuline mitochondriale est probablement organisée en hétérodimères α/β qui représentent environ 2% de la tubuline cellulaire. Enfin, des expériences d'immunoprécipitation ont montré que la tubuline mitochondriale est spécifiquement associée avec le VDAC mitochondrial (Carré et al., 2002). On peut à partir de ces données, émettre l'hypothèse qu'il existe un signal transmembranaire qui serait en mesure de modifier la perméabilité de VDAC donc de réguler la respiration mitochondriale selon l'interaction cytoplasmique de la β -tubuline 4, tissu spécifique, avec des MAP et les mitochondries.

Il reste encore énormément de recherches à effectuer pour répondre à toutes ces interrogations passionnantes. Les interactions entre MAP2, la tubuline (ou les microtubules) et VDAC restent à préciser. Le rôle physiologique de STOP est à ce jour inconnu car nos études ont été réalisées à 4°C et nous n'avons aucune idée du rôle de cette protéine à 37°C.

Par ailleurs, il y a également beaucoup à découvrir de l'énergétique dans le cerveau. Les souris STOP se sont révélées être un modèle animal proche de la schizophrénie humaine. Or, en 1991, Klushnik et ses collaborateurs ont montré que les tissus de cerveau de patients schizophrènes contenaient 5-10 fois moins de BB-CK et 1.5-3 moins de MiCK comparés à des contrôles. Ces altérations intracellulaires des isoformes de CK pourraient refléter des

tel-00011814, version 1 - 8 Mar 2006

modifications de la synthèse et de l'utilisation de la phosphocréatine. Plus récemment, il a été montré que chez des patients souffrant de schizophrénie, contrairement à d'autres maladies neurodégénératives, une activité réduite de certaines enzymes clés mitochondriales, par exemple le complexe de la pyruvate deshydrogénase, n'est pas fréquente mais que chez certains patients on pouvait trouver des anomalies des mitochondries du cerveau (Bubber et al., 2004). Plusieurs aspects soulignent le fait que le dysfonctionnement des mitochondries pourrait être impliqué dans la schizophrénie. Parmi eux, un métabolisme énergétique cérébral altéré, une hypoplasie mitochondriale, un dysfonctionnement de la phosphorylation oxydative et une expression altérée des gènes relatifs aux mitochondries. De plus, l'interaction entre la dopamine, un facteur étiologique prédominant dans la schizophrénie, et la respiration mitochondriale est considéré comme un mécanisme possible soulignant les cycles d'hypo- et hyper-activités de la schizophrénie (Ben-Shachar, 2002). Le dysfonctionnement des mitochondries entraîne des altérations dans la synthèse de l'ATP et les concentrations de calcium cytoplasmiques ainsi que la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'oxyde nitrique. Il est bien établi que tous ces processus mènent à une plasticité synaptique altérée. De plus, les mitochondries jouent un rôle dans la plasticité de la polarité neuronale. Ainsi un dysfonctionnement de la fonction mitochondriale pourrait être à l'origine (ou être la conséquence) d'anomalies de la plasticité synaptique dans la schizophrénie (Ben-Shachar et Laifenfeld., 2004). On imagine alors le rôle du cytosquelette dans cette plasticité et notamment celui des microtubules et de la protéine STOP.

Il y a encore une fois des perspectives très intéressantes de poursuivre l'étude des microtubules et la protéine STOP dans l'énergétique, cette fois ci cérébrale. Tout reste à faire dans ce domaine car la seule étude sur la protéine STOP et l'énergétique cellulaire est la notre et qu'il existe des animaux transgéniques.

Ma contribution dans ce travail est de 60% (préparation des échantillons biologiques, immunomarquages, tests oxygraphiques, participation à l'écriture de l'article).

5. Etude des modifications de la respiration mitochondriale de muscle squelettique chez des transplantés pulmonaires avant et après réhabilitation.

Lorsque la prise en charge médicale des insuffisants respiratoires est insuffisante et que le pronostic vital est engagé, une transplantation cardiaque ou pulmonaire peut-être envisagée en l'absence de contre-indication. Après transplantation thoracique, alors qu'il existe une amélioration considérable des facteurs centraux responsables de la limitation à l'effort par la restauration d'un débit cardiaque et d'une fonction respiratoire normale, la capacité d'effort maximale de ces patients reste très limitée, en pratique au 2/3 d'un sujet sédentaire du même âge. Parmi les problèmes non résolus comme le manque d'organes et le développement progressif de dysfonctions chroniques, la limitation de la consommation maximale d'oxygène ($VO_2\text{max}$) a été constatée depuis le début des années 90 sans explication définitive. Ainsi, il apparaît que les pathologies chroniques comme les BPCO et les cardiopathies conduisent à une baisse durable de la capacité d'effort, persistant pour une large part après transplantation thoracique. Cette limitation est liée à l'installation d'une myopathie progressive qui persiste après transplantation thoracique. Cette myopathie reconnaît de nombreuses causes potentielles : sédentarité, effets de l'hypoxie, de l'hypercapnie, de l'acidose, de l'inflammation systémique, effets de la cachexie respiratoire et cardiaque, des médicaments (béta-bloquants, calcium bloqueurs, corticoïdes, cyclosporine). Depuis, on a montré que les transplantés pulmonaires possèdent des réponses cardiaques et ventilatoires normales à l'exercice (Levy et al., 1993). Beaucoup d'auteurs pensent qu'une dysfonction des muscles squelettiques de ces patients pourrait expliquer leur limite d'exercice. Le métabolisme énergétique serait donc impliqué dans la genèse des altérations de la capacité à l'exercice.

A ce jour, les mécanismes cellulaires mis en jeu dans la limitation de la consommation de l'oxygène restent inconnus bien que la masse musculaire et le % de fibres de type I jouent un rôle important (Richardson et al., 2004).

Pour cette étude, nos hypothèses de travail étaient :

1. Malgré une diminution de la masse des muscles squelettiques et du % de fibres de type I partiellement due à l'état avancé de la maladie respiratoire, les altérations de l'organisation intracellulaire de la production d'énergie c'est à dire la respiration mitochondriale et le transfert via la navette créatine-phosphocréatine sont impliquées dans les limitations de la performance des muscles squelettiques.

2. La réhabilitation à domicile est capable d'améliorer ces anomalies.

Les mécanismes responsables de la limitation de la capacité à l'exercice des transplantés pulmonaires et les bénéfices de l'entraînement physique ont été étudiés. Les paramètres de la respiration mitochondriale, les transferts énergétiques et la structure cellulaire ont été étudiés dans des biopsies de vaste externe en utilisant la technique des fibres perméabilisées et des mesures histocytochimiques et morphométriques. Douze contrôles non sédentaires et douze transplantés pulmonaires ont suivi une réhabilitation de trois mois à domicile. Avant l'entraînement, de fortes corrélations entre la capacité à l'exercice ($VO_2\text{max}$ et temps d'endurance) et les événements cellulaires estimés par le % de fibres de type I et le K_m apparent pour l'ADP exogène. Les anti-calcineurines n'ont pas été impliqués dans la limitation à l'exercice des transplantés pulmonaire car avant le programme de réhabilitation, aucune différence dans la vitesse maximale de respiration mitochondriale (V_{max}) ni d'anomalies des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, comparé aux contrôles, n'ont été trouvées. La réhabilitation a résulté en une augmentation des paramètres physiologiques à la fois au niveau cellulaire (K_m apparent pour l'ADP exogène et effet stimulant de la créatine) et intégré ($VO_2\text{max}$, P_{seuil} , P_{max} , temps d'endurance) initialement plus faibles chez les transplanté comparés aux contrôles. Les changements de la $VO_2\text{max}$ après réhabilitation et la V_{max} ont été corrélés ainsi que les changements du temps d'endurance et du % de fibres de type I. Alors que nous n'avons constaté aucune modification des diamètres et des types de fibres, les altérations initiales des paramètres bioénergétiques et leurs améliorations après l'entraînement pourraient être reliés aux changements des unités énergétiques intracellulaires (ICEUs). Après le programme de réhabilitation, les ICEUs montrent un meilleur control de la respiration mitochondriale par la créatine et une augmentation des restrictions de diffusion des nucléotides adényliques résultant en de meilleures performances des contrôles et des transplantés pulmonaires.

Nos résultats, avant réhabilitation, montrent que le traitement immunosuppresseur par les anti-calcineurines a des effets négligeables sur respiration mitochondriale excluant une inhibition de complexes I et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale car la V_{max} des transplantés n'est pas significativement différente de celle des contrôles. Cette conclusion a

également été faite par Zoll et ses collaborateurs en 2003, a propos de transplantés cardiaques. Par ailleurs, la vitesse basale de respiration (V_o) était identique chez les TP et les contrôles. Ceci suggère que les capacités oxydatives intrinsèques du muscle sont normales chez les TP. Cependant, Le Km apparent pour l'ADP exogène était significativement plus bas chez les TP, principalement expliqué par la réduction du nombre de fibres de type I dans leurs muscles squelettiques comparés aux contrôles.

La première étude de l'effet de l'entraînement à court terme sur la respiration mitochondriale a été effectuée par Tonkonogi et al., en 2000, sur mitochondries isolées. Leurs résultats ont montré que le pouvoir oxydatif mitochondrial était augmenté mais que le rapport P/O (reflétant l'efficacité du transfert d'énergie) restait inchangé. Après réhabilitation, nous n'avons observé aucun changement des valeurs de vitesse de respiration mitochondriale. En revanche, le Km apparent pour l'ADP exogène augmente significativement d'un facteur 2 à la fois chez les contrôles et les TP. Cette observation est conforme à ce que Zoll a rapporté concernant l'activité physique et l'augmentation de l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP chez des transplantés cardiaques notamment (Zoll et al., 2002; 2003b). Le groupe de Sahlin a également rapporté que l'entraînement induisait une diminution de la sensibilité de la mitochondries pour l'ADP et une augmentation de la stimulation de la respiration par la créatine (Walsh et al., 2001a; Tonkonogi et Sahlin., 2002) Par ailleurs, cette augmentation ne s'accompagne pas de modification au niveau de la typologie ni de la morphologie des fibres musculaires. De plus, l'effet stimulant de la créatine sur la respiration est plus important qu'avant le programme d'entraînement ce qui signifie qu'il existe un meilleur couplage fonctionnel entre l'ANT et la MiCK ce qui caractéristique de l'organisation des mitochondries en complexes fonctionnels ou ICEUs grâce aux protéines du cytosquelette.

Le dysfonctionnement musculaire des TP pourrait induire des altérations alors que la réhabilitation pourrait induire une élévation dans l'expression de ces protéines et donc augmenter les restrictions de diffusion de l'ADP exogène dans les cellules musculaires. L'augmentation des barrières de restrictions pourrait contribuer à une meilleure canalisation métabolique au sein des ICEUs rendant le rôle de la navette Cr-PCr plus importante dans la régulation de la respiration mitochondriale (Saks et al., 2004) la phosphocréatine étant un important régulateur de la respiration mitochondriale stimulée par l'ADP (Walsh et al., 2001b).

Ces événements pourraient se produire très précocement et ne nous permettent pas de déterminer des corrélations évidentes avec les paramètres physiologiques intégrés car ils concernent le niveau intracellulaire sans impliquer des changements de type de fibres. Ces

processus pourraient être comparés à la phase précoce de l'ischémie cardiaque, où l'on perd en premier lieu le couplage fonctionnel ANT-MiCK alors que le cœur possède toujours ses propriétés fonctionnelles (Rossi et al., 1998).

Comme nous venons de le voir, la théorie des ICEUs peut ainsi expliquer des phénomènes cliniques. Ainsi l'étude de la respiration mitochondriale *in situ* dans des fibres perméabilisées de muscle squelettique permet un diagnostic efficace du métabolisme énergétique intracellulaire sur de petits échantillons de tissus humains.

Ma contribution dans ce travail se monte à 70% (préparation du matériel biologique, oxygraphie, rédaction de l'article, préparation des figures)

CONCLUSION et PERSPECTIVES

La principale thématique de ce travail est la régulation de la phosphorylation oxydative *in vivo* dans les cellules musculaires cardiaques et squelettiques. En étudiant les interactions entre les mitochondries et le cytoplasme, nous avons voulu montrer l'importance de l'organisation intracellulaire des mitochondries sous forme d'ICEUs (unités énergétiques intracellulaires) au sein desquelles mitochondries, cytosquelette, RS et myofibrilles interagissent pour former des couplages fonctionnels primordiaux dans la régulation de la fonction mitochondriale. Pour cette étude à la fois structurale et fonctionnelle des mitochondries, nous avons fait appel à différentes techniques telles que l'oxygraphie, la spectrophotométrie et pour une majeure partie aux techniques d'imagerie confocale mais également à la modélisation mathématique (avec le Dr Vendelin).

1. Dans les cellules cardiaques, l'arrangement intracellulaire des mitochondries hautement ordonné, tissu-spécifique, est proche de celui d'un cristal. Les mitochondries sont organisées de manière très précise au niveau de la bande A des sarcomères. Dans les muscles squelettiques, oxydatifs et glycolytiques, les mitochondries sont, quant à elles, organisées en paires situées au niveau des bandes I. Les distances entre mitochondries voisines sont très fortement conservées dans chacun des muscles étudiés. Cette conclusion va dans le sens de la nature unitaire de l'organisation du métabolisme énergétique du muscle où les phénomènes de fission et de fusion sont minimes.

2. Il existe deux niveaux de régulation de la sensibilité des mitochondries vis-à-vis de l'ADP : la perméabilité de la MME, au niveau de VDAC et les restrictions de diffusion, au voisinage des mitochondries dans l'intérieur des ICEUS des cellules cardiaques. L'origine et la nature de ces barrières de diffusion restent à identifier. Cependant, de nombreuses hypothèses nous permettent de penser qu'elles impliquent des protéines du cytosquelette. Ainsi, ces paramètres, perméabilité de la MME d'une part et hétérogénéité de diffusion d'autre part, expliquent en grande partie la valeur élevée du Km apparent pour l'ADP exogène dans les cellules de muscles à contraction lente contrairement aux cellules des muscles à contraction rapide et la canalisation métabolique de l'ADP endogène.

3. Dans les cellules des muscles oxydatifs, l'arrangement régulier intracellulaire des mitochondries au sein des ICEUs s'accompagne donc de propriétés fonctionnelles caractéristiques. Notre travail a montré que l'expression et l'organisation intracellulaire de la

β -tubuline ainsi que celles de la protéine STOP sont tissu-spécifiques (présentes dans les muscles oxydatifs). Nous avons mis en évidence que la présence ou non de tubuline est liée à la valeur élevée du Km apparent pour l'ADP dans les cellules musculaires et que ce n'est donc pas la forme polymérisée, en MT, qui est importante pour la régulation de la fonction mitochondriale dans les cellules musculaires (travaux sur souris STOP K/O). Notre conclusion est que la tubuline participe indirectement à ces mécanismes de régulation, qui font certainement intervenir d'autres MAP.

4. Une conséquence de ces phénomènes de restrictions de diffusion au sein des ICEUs, est le couplage fonctionnel entre l'ANT et la MiCK. Le couplage fonctionnel aboutit à la compartimentation des nucléotides adényliques au sein des cellules cardiaques. Nos résultats servent à interpréter la loi de Frank-Starling et la stabilité métabolique. L'augmentation de la consommation d'oxygène, selon la loi de Frank-Starling, est observée sans changement significatif des flux intracellulaires de calcium. La régulation par les ions calcium pourrait donc jouer un rôle mineur contrairement aux couplages fonctionnels au sein de l'organisation des cellules cardiaques en ICEUs.

5. Enfin, nous avons étudié les modifications de la respiration mitochondriale dans des muscles squelettiques de transplantés pulmonaires avant et après un programme de réhabilitation. Nos résultats montrent que le traitement par les anti-calcineurines n'affecte pas les propriétés intrinsèques de la chaîne respiratoire mitochondriale chez les TP. Après réhabilitation, l'affinité apparente des mitochondries pour l'ADP exogène augmente d'un facteur 2 à la fois chez les TP et les contrôles ne s'accompagnant d'aucun changement de typologie ni de morphométrie des fibres musculaires, mais d'une amélioration de la VO_2 max, et d'autres paramètres physiologiques intégrés. Nous n'avons pu établir de corrélations évidentes entre les paramètres bioénergétiques et physiologiques intégrés. Nous en concluons que nos observations, au niveau intracellulaire, sont intimement liées à l'organisation en ICEUs et que les modifications de ces complexes fonctionnels peuvent être des événements précoces ne pouvant être détectés au niveau tissulaire ou de l'organisme. Ainsi, notre théorie d'organisation structurale et fonctionnelle des mitochondries au sein des cellules musculaires permet d'établir un diagnostic très sensible du métabolisme énergétique pour de petits échantillons de tissus humains.

Donc, dans ce travail nous avons pu montrer différents aspects de la régulation de la phosphorylation oxydative dans les cellules de cœur et de muscles squelettiques *in situ* notamment en étudiant la position intracellulaire des mitochondries et les différences de cinétique de régulation de la respiration par l'ADP exogène et endogène. Mais surtout nous avons conforté notre hypothèse de l'importance des ICEUs où des mitochondries sont intégrées avec le RS et les myofibrilles et reliés par des couplages fonctionnels.

De nombreuses perspectives s'inscrivent dans cette thématique de recherche.

Tout d'abord concernant l'étude des ICEUS, les protéines qui sont responsables de cette architecture très précise devront être identifiées. Pour ceci, l'étude du cytosquelette devra être poursuivie soit par l'étude de MAP (MAP-2 par exemple), soit par l'étude d'autres candidats potentiels. Des travaux d'Appaix et al., avaient montré que la plectine, un cytolinker reliant les mitochondries et la desmine est sensible à un traitement protéolytique (Appaix et al., 2003). Ainsi l'utilisation d'animaux transgéniques pour des protéines du cytosquelette pourrait nous apporter de précieuses indications quant à la contribution des ces protéines dans la régulation de la fonction mitochondriale des cellules musculaires *in situ*. Malheureusement, les animaux déficients en plectine ne sont pas viables plus de 3 jours (Andra et al., 1997), en revanche, des souris MAP-2 K/O sont disponibles au Japon (Teng et al., 2001). D'autre part, des colonnes d'affinité entre VDAC et ces protéines pourrait être envisagées pour détecter une éventuelle interaction directe.

Il reste également à déterminer la localisation des barrières de restrictions de diffusion au voisinage des mitochondries ainsi que les mécanismes de canalisation de l'ADP endogène. De plus, la compartimentation de l'ADP et de l'ATP mérite d'être étudiée de manière plus approfondie. Ce travail est poursuivi par une étudiante de notre groupe dans le cadre de sa thèse. Afin de répondre à ces questions, elle va visualiser par microscopie confocale les flux intracellulaires d'ATP exogène dans des cellules cardiaques isolées, grâce à une sonde fluorescente d'ATP, et déterminer par spectrophotométrie les affinités apparentes des ATPases pour l'ADP endogène dans les différents types de muscle.

Une autre perspective de ce travail de thèse est de poursuivre l'étude de la protéine STOP et de déterminer son rôle physiologique dans les cellules cardiaques et de muscle squelettique oxydatif car à ce jour aucune étude n'a été réalisée sur cette protéine dans les tissus musculaires.

Par ailleurs, il serait également passionnant d'étudier le métabolisme énergétique cérébral avec à notre disposition des animaux transgéniques compte tenu de l'importance des avancées dans la compréhension des maladies neurodégénératives telles que la schizophrénie. Récemment Safiulina et al. a rapporté une méthode pour étudier la respiration de mitochondries dans les neurones *in situ* sans endommagement de leur environnement, c'est-à-dire principalement les interactions avec le cytosquelette (Safiulina et al., 2004). De premiers résultats sur des homogénats d'hippocampes (région riche en protéine STOP) semblaient prometteurs bien que le protocole soit entièrement à mettre au point. Cette étude peut également s'envisager sur préparations de synaptosomes d'hippocampe afin de déterminer les paramètres cinétiques de la respiration mitochondriale, le contrôle ou non de la respiration par la créatine et surtout l'existence d'une organisation structurale et fonctionnelle équivalente à celle des ICEUs des cellules musculaires.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Aguezzoul M., Andrieux A., Denarier E. 2003. *Overlap of promoter and coding sequences in the mouse STOP gene (Mtap6)*. Genomics 81:623-7.
- Agusti A.G., Noguera A., Sauleda J., Sala E., Pons J., Busquets X. 2003. *Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease*. Eur Respir J 21:347-60
- Albers K., Fuchs E. 1987. *The expression of mutant epidermal keratin cDNAs transfected in simple epithelial and squamous cell carcinoma lines*. J Cell Biol 105:791-806.
- Alexander C. et al. 2000. *OPAI, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28*. Nature Genet 26, 211-215.
- Aliev M.K., Saks V.A. 1997. *Compartmentalized energy transfer in cardiomyocytes: use of mathematical modeling for analysis of in vivo regulation of respiration*. Biophys J 73:428-45.
- Allen D.G., Jewell B.R., Murray J.W. 1974. *The contribution of activation processes to the length-tension relation of cardiac muscle*. Nature 248:606-607.
- Altschuld R.A., Wenger W.C., Lamka K.G., Kindig O.R., Capen C.C., Mizuhira V., Vander Heide R.S., Brierley G.P. 1985. *Structural and functional properties of adult rat heart myocytes lysed with digitonin*. J Biol Chem 260:14325-34.
- Amos L.A. 1985. *Structure of muscle filaments studied by electron microscopy*. Annu Rev Biophys Biophys Chem 14:291-313.
- Andersen P., Henriksson J. 1977. *Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of man: adaptive response to exercise*. J Physiol 270:677-90.
- Andersen J.L., Schjerling P., Saltin B. 2000. *Muscle, genes and athletic performance*. Sci Am 283:48-55.
- Andra K., Lassmann H., Bittner R., Shorny S., Fassler R., Propst F., Wiche G. 1997. *Targeted inactivation of plectin reveals essential function in maintaining the integrity of skin, muscle, and heart cytoarchitecture*. Genes Dev 11:3143-56.
- Andrienko T., Kuznetsov A.V., Kaambre T., Usson Y., Orosco A., Appaix F., Tiivel T., Sikk P., Vendelin M., Margreiter R., Saks V.A. 2003. *Metabolic consequences of functional complexes of mitochondria, myofibrils and sarcoplasmic reticulum in muscle cells*. J Exp Biol 206:2059-72.
- Andrieux A., Salin P.A., Vernet M., Kujala P., Baratier J., Gory-Faure S., Bosc C., Pointu H., Proietto D., Schweitzer A., Denarier E., Klumperman J., Job D. 2002. *The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders*. Genes Dev 16:2350-64.
- Anflous K., Armstrong D.D., Craigen W.J. 2001. *Altered mitochondrial sensitivity for ADP and maintenance of creatine-stimulated respiration in oxidative striated muscles from VDAC1-deficient mice*. J Biol Chem 276:1954-60.

Aon M.A., Cortassa S., O'Rourke B. 2004. *Percolation and criticality in a mitochondrial network*. Proc Natl Acad Sci U S A 101:4447-52.

Appaix F., Kuznetsov A.V., Usson Y., Kay L., Andrienko T., Olivares J., Kaambre T., Sikk P., Margreiter R., Saks V. 2003. *Possible role of cytoskeleton in intracellular arrangement and regulation of mitochondria*. Exp Physiol 88(1):175-90.

Aquila H., Link T.A., Klingenberg M. 1987. *Solute carriers involved in energy transfer of mitochondria form a homologous protein family*. FEBS Lett 212:1-9.

Arrio-Dupont M. 1988. *An example of substrate channeling between co-immobilized enzymes. Coupled activity of myosin ATPase and creatine kinase bound to frog heart myofilaments*. FEBS Lett 240:181-5.

B

Bach D., Pich S., Soriano F.X., Vega N., Baumgartner B., Oriola J., Daugaard J.R., Lloberas J., Camps M., Zierath J.R., Rabasa-Lhoret R., Wallberg-Henriksson H., Laville M., Palacin M., Vidal H., Rivera F., Brand M., Zorzano A. 2003. *Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity*. J Biol Chem 278:17190-7.

Bakeeva L.E., Chentsov Yu.S., Skulachev V.P. 1983. *Intermitochondrial contacts in myocardiocytes*. J Mol Cell Cardiol 15:413-20.

Balaban R.S. 1990. *Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell*. Am J Physiol 258:C377-89.

Balaban R.S. 2002. *Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium*. J Mol Cell Cardiol 34:1259-71.

Bangham A.D., Horne R.W., Glauert A.M., Dingle J.T., Lucy J.A. 1962. *Action of saponin on biological cell membranes*. Nature 196:952-5.

Barany M. 1967. *ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening*. J Gen Physiol 50:197-218.

Barbour R.L., Ribaud J., Chan S.H. 1984. *Effect of creatine kinase activity on mitochondrial ADP/ATP transport. Evidence for a functional interaction*. J Biol Chem 259:8246-51.

Bassett D.R. and Howley E.T. 2000. *Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance*. Med Sci Sports Exerc 32:70-84.

Ben-Shachar D. 2002. *Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: a possible linkage to dopamine*. J Neurochem 83:1241-51.

Ben-Shachar D., Laifenfeld D. 2004. *Mitochondria, synaptic plasticity, and schizophrenia*. Int Rev Neurobiol 59:273-96.

- Benz R. 1990. *Biophysical properties of porin pores from mitochondrial outer membrane of eukaryotic cells*. *Experientia* 46:131-7.
- Bereiter-Hahn J., Voth M. 1994. *Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria*. *Microsc Res Tech*. 27:198-219.
- Bergström J. 1975. *Percutaneous needle biopsy of skeletal muscle in physiological and clinical research*. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 35:609-616.
- Bernardi P., Petronilli V., Di Lisa F., Forte M. 2001. *A mitochondrial perspective on cell death*. *Trends Biochem Sci* 26:112-7.
- Bernier-Valentin F., Rousset B. 1982. *Interaction of tubulin with rat liver mitochondria*. *J Biol Chem* 257:7092-9.
- Bers D.M. 2002. *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*. Second edition. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Bershadsky A.D., Gelfand V.I., Svitkina T.M., Tint I.S. 1979. *Cold-stable microtubules in the cytoplasm of mouse embryo fibroblasts*. *Cell Biol Int Rep* 3:45-50.
- Bessman S.P., Yang W.C., Geiger P.J., Erickson-Viitanen S. 1980. *Intimate coupling of creatine phosphokinase and myofibrillar adenosinetriphosphatase*. *Biochem Biophys Res Commun* 96:1414-20.
- Bessman S.P., Geiger P.J. 1981. *Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle*. *Science* 211:448-52.
- Beyer K., Klingenberg M. 1985. *ADP/ATP carrier protein from beef heart mitochondria has high amounts of tightly bound cardiolipin, as revealed by ³¹P nuclear magnetic resonance*. *Biochemistry* 24:3821-3826.
- Bleazard W. et al. 1999. *The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast*. *Nature Cell Biol* 1, 298-304.
- Block M.R., Lauquin G.J., Vignais P.V. 1982. *Interaction of 3'-O-(1-naphthoyl)adenosine 5'-diphosphate, a fluorescent adenosine 5'-diphosphate analogue, with the adenosine 5'-diphosphate/adenosine 5'-triphosphate carrier protein in the mitochondrial membrane*. *Biochemistry* 21:5451-5457.
- Bosc C., Oenarier E., Andrieux A., Job D. 1999. *STOP proteins*. *Cell Struct Funct* 24:393-9.
- Borg T.K., Goldsmith E.C., Price R., Carver W., Terracio L., Samarel A.M. 2000. *Specialization at the Z line of cardiac myocytes*. *Cardiovasc Res* 46:277-85.
- Bossen E.H., Sommer J.R., Waugh R.A. 1978. *Comparative stereology of the mouse and finch left ventricle*. *Tissue Cell* 10:773-84.
- Boudina S., Laclau M.N., Tariosse L., Daret D., Gouverneur G., Bonoron-Adele S., Saks V.A., Dos Santos P. 2002. *Alteration of mitochondrial function in a model of chronic ischemia in vivo in rat heart*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H821-31.

Brandolin G, Dupont Y., Vignais P.V. 1985. *Substrate-induced modifications of the intrinsic fluorescence of the isolated adenine nucleotide carrier protein: demonstration of distinct conformational states.* Biochemistry 24:1991-1997.

Braun U., Paju K., Eimre M., Seppet E., Orlova E., Kadaja L., Trumbeckaite S., Gellerich F.N., Zierz S., Jockusch H., Seppet E.K. 2001. *Lack of dystrophin is associated with altered integration of the mitochondria and ATPases in slow-twitch muscle cells of MDX mice.* Biochim Biophys Acta 1505:258-70.

Brdiczka D., Wallimann T. 1994. *The importance of the outer mitochondrial compartment in regulation of energy metabolism.* Mol Cell Biochem 133-134:69-83.

Brenner B. 1987. *Mechanical and structural approaches to correlation of cross-bridge action in muscle with actomyosin ATPase in solution.* Annu Rev Physiol 49:655-72.

Brook M.H. and Kaiser K.K. 1970. *Muscle fiber types: how many and what kind?.* Arch Neurol 23:369-79.

Brzustowicz L.M., Hodgkinson K.A., Chow E.W., Honer W.G. and Bassett A.S. 2000. *Location of a major susceptibility locus for familial schizophrenia on chromosome 1q21-q22.* Science 288: 678-682

Bubber P., Tang J., Haroutunian V., Xu H., Davis K.L., Blass J.P., Gibson G.E. 2004. *Mitochondrial enzymes in schizophrenia.* J Mol Neurosci 24:315-21.

Buckley I.K., Porter K.R. 1967. *Cytoplasmic fibrils in living cultured cells. A light and electron microscope study.* Protoplasma 64:349-80.

Burelle Y., Hochachka P.W. 2002. *Endurance training induces muscle-specific changes in mitochondrial function in skinned muscle fibers.* J Appl Physiol 92:2429-38.

[Burns R.G.](#), [Surridge C.D.](#) 1995. *The phosphatidylinositol-binding site of microtubule-associated protein MAP2.* Biochem Soc Trans. 23(1):41-6.

Bussieres L.M., Pflugfelder P.W., Taylor A.W., Noble E.G., Kostuk W.J. 1997. *Changes in skeletal muscle morphology and biochemistry after cardiac transplantation.* Am J Cardiol 78:630-634.

Bygrave F.L., Lehninger A.L. 1967. *The affinity of mitochondrial oxidative phosphorylation mechanisms for phosphate and adenosine diphosphate.* Proc Natl Acad Sci U S A 57:1409-15.

C

Calaghan S.C., Le Guennec J.Y., White E. 2001. *Modulation of Ca(2+) signaling by microtubule disruption in rat ventricular myocytes and its dependence on the ruptured patch-clamp configuration.* Circ Res 88:E32-7.

Calaghan S.C., Le Guennec J.Y., White E. 2004. *Cytoskeletal modulation of electrical and mechanical activity in cardiac myocytes.* Prog Biophys Mol Biol 84:29-59.

Capetanaki Y. 2002. *Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function.* Trends Cardiovasc Med 12:339-48.

- Carafoli E. 2004. *Calcium-mediated cellular signals: a story of failures*. Trends Biochem Sci 29:371-9.
- Carre M., Andre N., Carles G., Borghi H., Bricchese L., Briand C., Braguer D. 2002. *Tubulin is an inherent component of mitochondrial membranes that interacts with the voltage-dependent anion channel*. J Biol Chem 277:33664-9.
- Cazorla O., Wu Y., Irving T.C., Granzier H. *Titin-based modulation of calcium sensitivity of active tension in mouse skinned cardiac myocytes*. Circ Res 88:1028-35.
- Chance B., Williams G.R. 1956. *The respiratory chain and oxidative phosphorylation*. Adv Enzymol Relat Subj Biochem 17:65-134.
- Choi S.S., Chan K.F., Ng H.K., Mak W.P. 1999. *Colchicine-induced myopathy and neuropathy*. Hong Kong Med J 5:204-207.
- Choquet D., Felsenfeld D.P., Sheetz M.P. 1997. *Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages*. Cell 88:39-48.
- Chou R.G., Stromer M.H., Robson R.M., Huiatt T.W. 1994. *Substructure of cytoplasmic dense bodies and changes in distribution of desmin and alpha-actinin in developing smooth muscle cells*. Cell Motil Cytoskeleton 29:204-14.
- Colombini M., 1979. *A candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane*. Nature 279:643-645.
- Colombini M. 1994. *Anion channels in the mitochondrial outer membrane*. Curr Top Membr 42:73-101.
- Colombini M. 2004. *VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol*. Mol Cell Biochem 256:107-115.
- Comte J., Maisterrena B., Gautheron D.C. 1976. *Lipid composition and protein profiles of outer and inner membranes from pig heart mitochondria. Comparison with microsomes*. Biochim Biophys Acta 419:271-84.
- Connett R.J. 1988. *Analysis of metabolic control: new insights using scaled creatine kinase model*. Am J Physiol 254:R949-59.
- Constable S.H., Favier R.J., McLane J.A., Fell R.D., Chen M, Holloszy J.O. 1987. *Energy metabolism in contracting rat skeletal muscle: adaptation to exercise training*. Am J Physiol 253:C316-22.
- Cortassa S., Aon M.A., Marban E., Winslow R.L., O'Rourke B. 2003. *An integrated model of cardiac mitochondrial energy metabolism and calcium dynamics*. Biophys J 84:2734-55.
- Coyle E.F. 1992. *Carbohydrate supplementation during exercise*. J Nutr 122:788-95.
- Cross R.L. 2000. *The rotary binding change mechanism of ATP synthases*. Biochim Biophys Acta 1458:270-5.
- Crozatier B., Badoual T., Boehm E., Ennezat P.V., Guenoun T., Su J., Veksler V., Hittinger L., Ventura-Clapier R. 2002. *Role of creatine kinase in cardiac excitation-contraction coupling: studies in creatine kinase-deficient mice*. FASEB J 16:653-60.

Cunningham C.C., Leclerc N., Flanagan L.A., Lu M., Janmey P.A., Kosik K.S. 1997. *Microtubule-associated protein 2c reorganizes both microtubules and microfilaments into distinct cytological structures in an actin-binding protein-280-deficient melanoma cell line.* J Cell Biol 136:845-57.

D

Decker W.K., Craigen W.J. 2000. *The tissue-specific, alternatively spliced single ATG exon of the type 3 voltage-dependent anion channel gene does not create a truncated protein isoform in vivo.* Mol Genet Metab 70:69-74.

De Deyn P.P., Ceuterick C., Saxena V., Crols R., Chappel R., Martin J.J. 1995. *Chronic colchicine-induced myopathy and neuropathy.* Acta Neurol Belg 95:29-32.

Degens H., Turek Z., Hoofd L.J., Van't Hof M.A., Binkhorst R.A. 1992. *The relationship between capillarisation and fibre types during compensatory hypertrophy of the plantaris muscle in the rat.* J Anat 180:455-63.

de Graaf R.A., van Kranenburg A., Nicolay K. 2000. *In vivo (31)P-NMR diffusion spectroscopy of ATP and phosphocreatine in rat skeletal muscle.* Biophys J 78:1657-64.

Demirel H.A., Powers S.K., Naito H., Hugues M., Coombes J.S. 1999. *Exercise-induced alterations in skeletal muscle myosin heavy chain phenotype: dose-response relationship.* J Appl Physiol 86:1002-8.

Demsey J.A., Hanson P.G., Henderson K.S. 1984. *Exercise-induced arterial hypoaemia in healthy human subjects at sea level.* J Physiol 355:161-75.

Denarier E., Aguezzoul M., Jolly C., Vourc'h C., Roure A., Andrieux A., Bosc C. and Job, D. 1998a. *Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse STOP gene (Mtap6).* Biochem. Biophys. Res. Commun 243: 791-796.

Denarier E., Fourest-Lieuvain A., Bosc C., Pirollet F., Chapel A., Margolis R.L. and Job, D. 1998b. *Nonneuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts.* Proc. Natl. Acad. Sci 95: 6055-6060.

Denk W., Strickler J.H., Webb W.W. 1990. *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy.* Science 248:73-6.

Diaz J.F., Pantos E., Bordas J., Andreu J.M. 1994. *Solution structure of GDP-tubulin double rings to 3 nm resolution and comparison with microtubules.* J Mol Biol 238:214-25.

Dick D.J., Lab M.J. 1998. *Mechanical modulation of stretch-induced premature ventricular beats: induction of mechanoelectric adaptation period.* Cardiovasc Res. 38:181-91.

Dudley G.A., Abraham W.M., Terjung R.L. 1982. *Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle.* J Appl Physiol 53:844-50.

Dzeja P.P., Zeleznikar R.J., Goldberg N.D. 1998. *Adenylate kinase: kinetic behavior in intact cells indicates it is integral to multiple cellular processes.* Mol Cell Biochem 184:169-82.

Dzeja P.P., Terzic A., Wieringa B. 2004. *Phosphotransfer dynamics in skeletal muscle from creatine kinase gene-deleted mice*. Mol Cell Biochem 256-257:13-27.

E

Eisenberg B.R., Kuda A.M., Peter J.B. 1974. *Stereological analysis of mammalian skeletal muscle. I. Soleus muscle of the adult guinea pig*. J Cell Biol 60:732-54.

Eisenberg B.R., Kuda A.M. 1975. *Stereological analysis of mammalian skeletal muscle. II. White vastus muscle of the adult guinea pig*. J Ultrastruct Res 51:176-87.

Eisenberg B.R., Kuda A.M. 1976. *Discrimination between fiber populations in mammalian skeletal muscle by using ultrastructural parameters*. J Ultrastruct Res 54:76-88.

Ekblom B.T. 2000. *Blood boosting and sport*. Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 14:89-98.

Elston T., Wang H., Oster G. 1998. *Energy transduction in ATP synthase*. Nature 29:510-3.

Endo M., Kitazawa T. 1978. *E-C coupling studies in skinned cardiac fibers*. In: M Morad (ed). Biophysical Aspects of Cardiac Muscle, Academic, New York, pp 307-327.

Eppenberger H.M., Eppenberger M, Richtercih R., Aebi H. 1964. *The ontogeny of creatine kinase isoenzymes*. Dev Biol 10:1-16.

Eppenberger H.M., Dawson D.M., Kaplan N.O. 1967. *The comparative enzymology of creatine kinases. I. Isolation and characterization from chicken and rabbit tissues*. J Biol Chem 242:204-9.

Erickson H.P. 1995. *FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin?* Cell 80:367-70.

Erickson H.P., Taylor D.W., Taylor K.A., Bramhill D. 1996. *Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers*. Proc Natl Acad Sci U S A 93:519-23.

F

Fawcett D.W., McNutt N.S. 1969. *The ultrastructure of the cat myocardium. I. Ventricular papillary muscle*. J Cell Biol 42:1-45.

Fernstrom M., Tonkonogi M., Sahlin K. 2004. *Effects of acute and chronic endurance exercise on mitochondrial uncoupling in human skeletal muscle*. J Physiol 554:755-63.

Fiek C., Benz R., Roos N., Brdiczka D. 1982. *Evidence for identity between the hexokinase-binding protein and the mitochondrial porin in the outer membrane of rat liver mitochondria*. Biochim Biophys Acta 688:429-40.

Fioret C., Trezeguet V., LeSaux A., Roux P., Schwimmer C., Dianoux A.C., Noel F., Lauquin G.J-M., Brandolin G., Vignais P.V. 1998. *The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological aspects*. Biochimie 80:137-150.

Fontaine E.M., Keriel C., Lantuejoul S., Rigoulet M., Leverve X.M., Saks V.A. 1995. *Cytoplasmic cellular structures control permeability of outer mitochondrial membrane for ADP and oxidative phosphorylation in rat liver cells.* Biochem Biophys Res Commun 213:138-46.

Forbes M.S., Sperelakis N. 1995. *Ultrastructure of mammalian cardiac muscle, in Physiology and Pathophysiology of the heart.* Sperelakis N (ed.). Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers 1-35.

Fossel E.T., Hoefeler H. 1987. *A synthetic functional metabolic compartment. The role of propinquity in a linked pair of immobilized enzymes.* Eur J Biochem 170:165-71.

Franzini-Armstrong C. 1972. *Studies of the triad. 3. Structure of the junction in fast twitch fibers.* Tissue Cell 4:469-78.

Fuchs E., Cleveland D.W. 1998. *A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease.* Science 279:514-9.

Fuchs E., Weber K. 1994. *Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease.* Annu Rev Biochem 63:345-82.

Furst D.O., Gautel M. 1995. *The anatomy of a molecular giant: how the sarcomere cytoskeleton is assembled from immunoglobulin superfamily molecules.* J Mol Cell Cardiol 27:951-9.

G

Garnier A., Fortin D., Zoll J., N'Guessan B., Mettauer B., Lampert E., Veksler V., Ventura-Clapier R. 2005. *Coordinated changes in mitochondrial function and biogenesis in healthy and diseased human skeletal muscle.* FASEB J 19:43-52.

Garlid K.D., Jaburek M., Varecha M. 2000. *How do uncoupling proteins uncouple?.* Biochim Biophys Acta 1459:383-9.

Geiger B., Dutton A.H., Tokuyasu K.T., Singer S.J. 1981. *Immunoelectron microscope studies of membrane-microfilament interactions: distributions of alpha-actinin, tropomyosin, and vinculin in intestinal epithelial brush border and chicken gizzard smooth muscle cells.* J Cell Biol 91:614-28.

Geisler N., Kaufmann E., Fischer S., Plessmann U., Weber K. 1983. *Neurofilament architecture combines structural principles of intermediate filaments with carboxy-terminal extensions increasing in size between triplet proteins.* EMBO J 2:1295-302.

Gellerich F.N., Schlame M., Bohnensack R., Kunz W. 1987. *Dynamic compartmentation of adenine nucleotides in the mitochondrial intermembrane space of rat-heart mitochondria.* Biochim Biophys Acta 890:117-26.

Gellerich F.N., Kapischke M., Kunz W., Neumann W., Kuznetsov A., Brdiczka D., Nicolay K. 1994. *The influence of the cytosolic oncotic pressure on the permeability of the mitochondrial outer*

membrane for ADP: implications for the kinetic properties of mitochondrial creatine kinase and for ADP channelling into the intermembrane space. *Mol Cell Biochem* 133-134:85-104.

Gellerich F.N., Laterveer F.D., Korzeniewski B., Zierz S., Nicolay K. 1998. *Dextran strongly increases the Michaelis constants of oxidative phosphorylation and of mitochondrial creatine kinase in heart mitochondria.* *Eur J Biochem* 254:172-80.

Gellerich F.N., Laterveer F.D., Zierz S., Nicolay K. 2002. *The quantitation of ADP diffusion gradients across the outer membrane of heart mitochondria in the presence of macromolecules.* *Biochim Biophys Acta* 1554:48-56.

Goldman Y.E. 1987. *Kinetics of the actomyosin ATPase in muscle fibers.* *Annu Rev Physiol* 49:637-54.

Goldstein M.A., Entman M.L. 1979. *Microtubules in mammalian heart muscle.* *J Cell Biol* 80:183-95.

Gordon A.M., Regnier M., Homsher E. 2001. *Skeletal and cardiac muscle contractile activation: tropomyosin "rocks and rolls".* *News Physiol Sci* 16:49-55.

Gorza, L. 1990. *Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies.* *J.Histochem.Cytochem* 38:257-65.

Greenhaff PL. 2001. *The creatine-phosphocreatine system: there's more than one song in its repertoire.* *J Physiol* 537:657.

Griparic L. and van der Blik A.M. 2001. *The many shapes of mitochondrial membranes.* *Traffic* 2, 235-244.

Gropp T., Brustovetsky N., Klingenberg M., Müller V., Fendler K., Bamberg E. 1999. *Kinetics of electrogenic transport by the ADP/ATP carrier.* *Biophys J.* 77:714-726.

Guillaud L., Bosc C., Fourest-Lieuvin A., Denarier E., Pirollet F., Lafanechère L. and Job, D. 1998. *STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells.* *J. Cell Biol* 142: 167-179.

Gurland G., Gundersen G.G. 1995. *Stable, detyrosinated microtubules function to localize vimentin intermediate filaments in fibroblasts.* *J Cell Biol* 131:1275-90.

H

Hackenberg H., Klingenberg M. 1980. *Molecular weight and hydrodynamic parameters of the adenosine 5'-diphosphate-adenosine 5'-triphosphate carrier in Triton X-100.* *Biochemistry* 19:548-555.

[Hales KG](#), [Fuller MT](#). 1997. *Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase.* *Cell.* 90(1):121-9.

Halestrap A.P., McStay G.P., Clarke S.J. 2002. *The permeability transition pore complex: another view.* *Biochimie* 84:153-66.

- Harris, D.A., and Das A.M. 1991. *Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart*. Biochem. J 280:561–573.
- Hein S., Scheffold T., Schaper J. 1995. *Ischemia induces early changes to cytoskeletal and contractile proteins in diseased human myocardium*. J Thorac Cardiovasc Surg 110:89-98.
- Heineman, F.W., and Balaban R.S. 1990. *Control of mitochondrial respiration in the heart in vivo*. Annu. Rev. Physiol 52:523–542.
- Heins S., Wong P.C., Muller S., Goldie K., Cleveland D.W., Aebi U. 1993. *The rod domain of NF-L determines neurofilament architecture, whereas the end domains specify filament assembly and network formation*. J Cell Biol 123:1517-33.
- Henriksson K.G. 1979. *Muscle biopsy technics*. Scand J Rheumatol Suppl 30:74-9.
- Hermann G.J. et al. 1998. *Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p*. J Cell Biol 143:359-373.
- Heytler P.G. 1980. *Uncouplers of oxidative phosphorylation*. Pharmacol Ther 10:461-72.
- Hill A.V. and Lupton H. 1923. *Muscular exercise, lactic acid, and the supply and utilization of oxygen*. Q J Med 16:135-171.
- Hinkle P.C., Yu M. 1979. *The phosphorus/oxygen ratio of mitochondrial oxidative phosphorylation*. J Biol Chem 7:2450-2455.
- Hoffmann B., Stockl A., Schlame M, Beyer K., Klingenberg M. 1994. *The reconstituted ADP/ATP carrier activity has an absolute requirement for cardiolipin as shown in cysteine mutants*. J Biol Chem 269:1940-1944.
- Hodge T., Colombini M. 1997. *Regulation of metabolite flux through voltage-gating of VDAC channels*. J Membr Biol 157:271-9.
- Hokanson JF, Mercier JG, Brooks GA. 1995. *Cyclosporine A decreases rat skeletal muscle mitochondrial respiration in vitro*. Am J Respir Crit Care Med 151:1848-1851.
- Honig C.R., Connett R.J., Gayeski T.E. 1992. *O₂ transport and its interaction with metabolism; a systems view of aerobic capacity*. Med Sci Sports Exerc 24:47-53.
- Hongo K., Brette F., Haroon M.M., White E. 2000. *Mechanisms associated with the negative inotropic effect of deuterium oxide in single rat ventricular myocytes*. Exp Physiol 85:133-42.
- Hood D.A. 2001. *Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle*. J Appl Physiol 90:1137-57.
- Hori M., Sato H., Kitakaze M., Iwai K., Takeda H., Inoue M., Kamada T. 1994. *Beta-adrenergic stimulation disassembles microtubules in neonatal rat cultured cardiomyocytes through intracellular Ca²⁺ overload*. Circ Res 75:324-34.
- Hornemann T., Kempa S., Himmel M., Hayess K., Furst D.O., Wallimann T. 2003. *Muscle-type creatine kinase interacts with central domains of the M-band proteins myomesin and M-protein*. J Mol Biol 332:877-87.

Howarth F.C., Calaghan S.C., Boyett M.R., White E. 1999. *Effect of the microtubule polymerizing agent taxol on contraction, Ca²⁺ transient and L-type Ca²⁺ current in rat ventricular myocytes.* J Physiol 516:409-19.

Huizing M., Ruitenbeek W., Thinnis F.P., DePinto V., Wendel U., Trijbels F.J., Smit L.M., ter Laak H.J., van den Heuvel L.P. 1996. *Deficiency of the voltage-dependent anion channel: a novel cause of mitochondriopathy.* Pediatr Res 39:760-5.

Huxley H.E. 1969. *The mechanism of muscular contraction.* Science 164:1356-1366.

Huxley AF, Simmons RM. 1971. *Proposed mechanism of force generation in striated muscle.* Nature 233:533-8.

I

Inui M, Saito A, Fleischer S. 1987a. *Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures.* J Biol Chem 262:15637-42.

Inui M, Saito A, Fleischer S. 1987b. *Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle.* J Biol Chem 262:1740-7.

Ishibashi Y., Tsutsui H., Yamamoto S., Takahashi M., Imanaka-Yoshida K., Yoshida T., Urabe Y., Sugimachi M., Takeshita A. 1996. *Role of microtubules in myocyte contractile dysfunction during cardiac hypertrophy in the rat.* Am J Physiol. 271:H1978-87.

Iyengar MR. 1984. *Creatine kinase as an intracellular regulator.* J Muscle Res Cell Motil 5:527-34.

Iwai K., Hori M., Kitabatake A., Kurihara H., Uchida K., Inoue M., Kamada T. 1990. *Disruption of microtubules as an early sign of irreversible ischemic injury. Immunohistochemical study of in situ canine hearts.* Circ Res 67:694-706.

J

Jacobson J., Duchon M.R. 2004. *Interplay between mitochondria and cellular calcium signalling.* Mol Cell Biochem 256-257:209-18.

Jacobus W.E., Lehninger A.L. 1973 *Creatine kinase of rat heart mitochondria. Coupling of creatine phosphorylation to electron transport.* J Biol Chem 248:4803-10.

Jacobus W.E., Saks V.A. 1982. *Creatine kinase of heart mitochondria: changes in its kinetic properties induced by coupling to oxidative phosphorylation.* Arch Biochem Biophys 219:167-78.

Jacobus W.E. 1985. *Respiratory control and the integration of heart high-energy phosphate metabolism by mitochondrial creatine kinase.* Annu Rev Physiol 47:707-25.

Janssen E., Terzic A., Wieringa B., Dzeja P.P. 2003. *Impaired intracellular energetic communication in muscles from creatine kinase and adenylate kinase (M-CK/AK1) double knock-out mice.* J Biol Chem 278:30441-9.

Jeffrey F.M., Malloy C.R. 1992. *Respiratory control and substrate effects in the working rat heart*. Biochem J 287:117-23.

Job D., Fischer E.H., Margolis R.L. 1981. *Rapid disassembly of cold-stable microtubules by calmodulin*. Proc Natl Acad Sci U S A 78:4679-82.

Jorgensen A.O., Shen A.C., Arnold W., Leung A.T., Campbell K.P. 1989. *Subcellular distribution of the 1,4-dihydropyridine receptor in rabbit skeletal muscle in situ: an immunofluorescence and immunocolloidal gold-labeling study*. J Cell Biol 109:135-47.

Joshi H.C. 1994. *Microtubule organizing centers and gamma-tubulin*. Curr Opin Cell Biol 6:54-62.

Joubert F., Mateo P., Gillet B., Beloeil J.C., Mazet J.L., Hoerter J.A. 2004. *CK flux or direct ATP transfer: versatility of energy transfer pathways evidenced by NMR in the perfused heart*. Mol Cell Biochem 256-257:43-58.

K

Kaasik A., Veksler V., Boehm E., Novotova M., Minajeva A., Ventura-Clapier R. 2001. *Energetic crosstalk between organelles: architectural integration of energy production and utilization*. Circ Res 89:153-9.

Kaasik A., Veksler V., Boehm E., Novotova M., Ventura-Clapier R. 2003. *From energy store to energy flux: a study in creatine kinase-deficient fast skeletal muscle*. FASEB J 17:708-10.

Kadenbach A. 2003. *Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation*. Biochim Biophys Acta 1604:77-94.

Kanbara, K., Sakai, A., Watanabe, M., Furuya, E., and Shimada, M. 1997. *Distribution of fiber types determined by in situ hybridization of myosin heavy chain mRNA and enzyme histochemistry in rat skeletal muscles*. Cell Mol.Biol 43:319-27.

Kaprielian R.R., Stevenson S., Rothery S.M., Cullen M.J., Severs N.J. 2000. *Distinct patterns of dystrophin organization in myocyte sarcolemma and transverse tubules of normal and diseased human myocardium*. Circulation 101:2586-94.

Kay L., Li Z., Mericskay M., Olivares J., Tranqui L., Fontaine E., Tiivel T., Sikk P., Kaambre T., Samuel J.L., Rappaport L., Usson Y., Leverve X., Paulin D., Saks V.A. 1997. *Study of regulation of mitochondrial respiration in vivo. An analysis of influence of ADP diffusion and possible role of cytoskeleton*. Biochim Biophys Acta 1322:41-59.

Kentish J.C., Wrzosek A. 1998. *Changes in force and cytosolic Ca²⁺ concentration after length changes in isolated rat ventricular trabeculae*. J Physiol 506:431-44.

Kerfant B.G., Vassort G., Gomez A.M. 2001. *Microtubule disruption by colchicine reversibly enhances calcium signaling in intact rat cardiac myocytes*. Circ Res 88:E59-65.

Kholodenko B.N., Westerhoff H.V. 1993a. *Metabolic channelling and control of the flux*. FEBS Lett 320:71-4.

- Kholodenko B.N., Demin O.V., Westerhoff H.V. 1993b. 'Channelled' pathways can be more sensitive to specific regulatory signals. FEBS Lett 320:75-8.
- Kholodenko B.N., Cascante M., Westerhoff H.V. 1993c. Dramatic changes in control properties that accompany channelling and metabolite sequestration. FEBS Lett 336:381-4.
- Kholodenko B.N., Cascante M., Westerhoff H.V. 1995. Control theory of metabolic channelling. Mol Cell Biochem 143:151-68.
- Kinosita K.Jr., Yasuda R., Noji H., Ishiwata S., Yoshida M. 1998. F_1 -ATPase. A rotary motor made of a single molecule. Cell 93:21-24.
- Kinsey S.T., Locke B.R., Penke B., Moerland T.S. 1999. Diffusional anisotropy is induced by subcellular barriers in skeletal muscle. NMR Biomed 12:1-7.
- Kirkwood S.P., Munn E.A., Brooks G.A. 1986. Mitochondrial reticulum in limb skeletal muscle. Am J Physiol 251:C395-402.
- Klietsch R., Ervasti J.M., Arnold W., Campbell K.P., Jorgensen A.O. 1993. Dystrophin-glycoprotein complex and laminin colocalize to the sarcolemma and transverse tubules of cardiac muscle. Circ Res 72:349-60.
- Klingenberg M. 1969. Membrane protein oligomeric structure transport function. Nature 290:449-454.
- Klingenberg M. 1979. The ADP, ATP shuttle of the mitochondrion. Trends Biochem Sci 4:249-252.
- Klingenberg M. 1993. Dialectics in carrier research: the ADP/ATP carrier and the uncoupling protein. J Bioenerg Biomembr 25:447-57.
- Klushnik T.P., Spunde A.Ya., Yakovlev A.G., Khuchua Z.A., Saks V.A., Vartanyan M.E. 1991. Intracellular alterations of the creatine kinase isoforms in brains of schizophrenic patients. Mol Chem Neuropathol 15:271-80.
- [Kokoszka J.E.](#), [Waymire K.G.](#), [Levy S.E.](#), [Sligh J.E.](#), [Cai J.](#), [Jones D.P.](#), [MacGregor G.R.](#), [Wallace D.C.](#) 2004. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. Nature. 427(6973):461-5.
- Korge P., Byrd S.K., Campbell K.B. 1993. Functional coupling between sarcoplasmic-reticulum-bound creatine kinase and $Ca(2+)$ -ATPase. Eur J Biochem 213:973-80.
- Korge P., Campbell K.B. 1994. Local ATP regeneration is important for sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump function. Am J Physiol 267:C357-66.
- Korn E.D. 1969. Cell membranes: structure and synthesis. Annu Rev Biochem 38:263-88.
- Korzeniewski B. 1998. Regulation of ATP supply during muscle contraction: theoretical studies. Biochem J 330:1189-95.
- Korzeniewski B., Zoladz J.A. 2001. A model of oxidative phosphorylation in mammalian skeletal muscle. Biophys Chem 92:17-34.
- Kostin S., Heling A., Hein S. 1998. The protein composition of the normal and the diseased cardiac myocyte. Heart Failure Rev 2:245-260.

- Kostin S., Hein S., Arnon E., Scholz D., Schaper J. 2000. *The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart*. Heart Failure Rev 5:271-280.
- Kramer R., Klingenberg M. 1989. *Reconstitution of adenine transport from beef heart mitochondria*. Biochemistry 18:4209-4215.
- Krause S.M., Jacobus W.E. 1992. *Specific enhancement of the cardiac myofibrillar ATPase by bound creatine kinase*. J Biol Chem 267:2480-6.
- Kummel L. 1998. *Ca, Mg-ATPase activity of permeabilised rat heart cells and its functional coupling to oxidative phosphorylation of the cells*. Cardiovasc Res 22:359-67.
- Kunz W.S., Kuznetsov A.V., Schulze W., Eichhorn K., Schild L., Striggow F., Bohnensack R., Neuhof S., Grasshoff H., Neumann H.W. 1993a. *Functional characterization of mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers*. Biochim Biophys Acta 1144:46-53.
- Kunz W.S., Kuznetsov A.V., Gellerich F.N. 1993b. *Mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers is stimulated by caffeine*. FEBS Lett 323:188-90.
- Kupriyanov V.V., Seppet E.K., Emelin I.V., Saks V.A. 1980. *Phosphocretine production coupled to the glycolytic reactions in the cytosol of cardiac cells*. Biochim Biophys Acta 592:197-210.
- Kuznetsov A.V., Saks V.A. 1986. *Affinity modification of creatine kinase and ATP-ADP translocase in heart mitochondria: determination of their stoichiometric ratio* Biokhimiia 51:1426-37.
- Kuznetsov A.V., Tiivel T., Sikk P., Kaambre T., Kay L., Daneshrad Z., Rossi A., Kadaja L., Peet N., Seppet E., Saks V.A. 1996. *Striking differences between the kinetics of regulation of respiration by ADP in slow-twitch and fast-twitch muscles in vivo*. Eur J Biochem 241:909-15.

L

- Labrousse A.M., Zapattera M, Rube D.A and van der Bliet A.M. 1999. *C. elegans dynamin-related protein drp-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane*. Mol Cell 4, 815-826.
- Lampert E., Mettauer B., Hoppeler H., Charloux A., Charpentier A., Lonsdorfer J. 1998. *Skeletal muscle response to short endurance training in heart transplant recipients*. J Am Coll Cardiol 32:420-6.
- Langanger G., de Mey J., Moeremans M., Daneels G., de Brabander M., Small J.V. 1984. *Ultrastructural localization of alpha-actinin and filamin in cultured cells with the immunogold staining (IGS) method*. J Cell Biol 99:1324-34.
- Lardy H.A., Wellman H. 1952. *Oxidative phosphorylations; role of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates*. J Biol Chem 195:215-24.
- Larsen T.H., Dalen H., Sommer J.R., Boyle R., Lieberman M. 1999. *Membrane skeleton in cultured chick cardiac myocytes revealed by high resolution immunocytochemistry*. Histochem Cell Biol 112:307-16.

- Larsen T.H., Dalen H., Boyle R., Souza M.M., Lieberman M. 2000. *Cytoskeletal involvement during hypo-osmotic swelling and volume regulation in cultured chick cardiac myocytes*. *Histochem Cell Biol* 113:479-88.
- Lazarides E., Granger B.L. 1982. *Preparation and assay of the intermediate filament proteins desmin and vimentin*. *Methods Enzymol* 85:488-508.
- Lee A.C., Zizi M., Colombini M. 1994. *Beta-NADH decreases the permeability of the mitochondrial outer membrane to ADP by a factor of 6*. *J Biol Chem* 269:30974-80.
- Lee C., Gu Q., Xiong Y., Michell R.A., Ernster L. 1996a. *P/O ratios reassessed: mitochondrial P/O ratios consistently exceed 1.5 with succinate and 2.5 with NAD-linked substrates*. *FASEB J* 10:345-350.
- Lee A.C., Xu X., Colombini M. 1996b. *The role of pyridine dinucleotides in regulating the permeability of the mitochondrial outer membrane*. *J Biol Chem* 271:26724-31.
- Letai A., Coulombe P.A., Fuchs E. 1992. *Do the ends justify the mean? Proline mutations at the ends of the keratin coiled-coil rod segment are more disruptive than internal mutations*. *J Cell Biol* 116:1181-95.
- Leterrier J.F., Rusakov D.A., Nelson B.D., Linden M. 1994. *Interactions between brain mitochondria and cytoskeleton: evidence for specialized outer membrane domains involved in the association of cytoskeleton-associated proteins to mitochondria in situ and in vitro*. *Microsc Res Tech* 27(3):233-61.
- Levitskii D.O., Levchenko T.S., Saks V.A., Sharov V.G., Smirnov V.N. 1977. *The functional coupling between Ca²⁺-ATPase and creatine phosphokinase in heart muscle sarcoplasmic reticulum*. *Biokhimiia* 42:1766-73.
- Levy RD, Ernst P, Levine SM, Shennib H, Anzueto A, Bryan CL, Calhoon JH, Trinkle JK, Jenkinson SG, Gibbons WJ. 1993. *Exercise performance after lung transplantation*. *J Heart Lung Transplant* 12:27-33.
- Li M., Dalakas M.C. 2001. *Abnormal desmin protein in myofibrillar myopathies caused by desmin gene mutations*. *Ann Neurol* 49:532-6.
- Li Z., Colucci-Guyon E., Pincon-Raymond M., Mericskay M., Pournin S., Paulin D., Babinet C. 1996. *Cardiovascular lesions and skeletal myopathy in mice lacking desmin*. *Dev Biol* 175:362-6.
- Liao G., Gundersen G.G. 1998. *Kinesin is a candidate for cross-bridging microtubules and intermediate filaments. Selective binding of kinesin to detyrosinated tubulin and vimentin*. *J Biol Chem* 273:9797-803.
- Lieuvin A., Labbe J.C., Doree M., Job D. 1994. *Intrinsic microtubule stability in interphase cells*. *J Cell Biol* 124:985-96.
- Lin A., Krockmalnic G., Penman S. 1990. *Imaging cytoskeleton-mitochondrial membrane attachments by embedment-free electron microscopy of saponin-extracted cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8565-9.

- Linden M., Karlsson G. 1996. *Identification of porin as a binding site for MAP2*. *Biochem Biophys Res Commun* 218:833-6.
- Liobikas J., Kopustinskiene D.M., Toleikis A. 2001. *What controls the outer mitochondrial membrane permeability for ADP: facts for and against the role of oncotic pressure*. *Biochim Biophys Acta* 1505:220-5.
- Little M., Seehaus T. 1988. *Comparative analysis of tubulin sequences*. *Comp Biochem Physiol B* 90:655-70.
- Liu M.Y., Colombini M. 1992. *Regulation of mitochondrial respiration by controlling the permeability of the outer membrane through the mitochondrial channel, VDAC*. *Biochim Biophys Acta* 1098:255-60.
- Liu M.Y., Torgrimson A., Colombini M. 1994. *Characterization and partial purification of the VDAC-channel-modulating protein from calf liver mitochondria*. *Biochim Biophys Acta* 1185:203-12.
- Lockard VG, Bloom S. 1993. *Trans-cellular desmin-lamin B intermediate filament network in cardiac myocytes*. *J Mol Cell Cardiol.* 25:303-9.
- Lohmann K. 1934. *Über die enzymatische aufspaltung der kreatinphosphorsäure;Zugleich ein beitrage zum chemismus der muskelkontraktion*. *Biochem Z* 271:264-277.

M

- Mahler M. 1985. *First-order kinetics of muscle oxygen consumption, and an equivalent proportionality between QO_2 and phosphorylcreatine level. Implications for the control of respiration*. *J Gen Physiol* 86:135-65.
- Mallory L.A., Scheuermann B.W., Hoelting B.D., Weiss M.L., McAllister R.M., Barstow T.J. 2002. *Influence of peak VO_2 and muscle fiber type on the efficiency of moderate exercise*. *Med Sci Sports Exerc* 34:1279-87.
- Maltais F., Simard A., Simard C., Jobin J., Desgagnes P., LeBlanc P. 1996. *Oxidative capacity of the skeletal muscle and lactic acid kinetics during exercise in normal subjects and in patients with COPD*. *Am J Respir Crit Care Med* 153:288-293.
- Mandelkow E., Mandelkow E.M. 1995. *Microtubules and microtubule-associated proteins*. *Curr Opin Cell Biol* 7:72-81.
- Maniotis A.J., Chen C.S., Ingber D.E. 1997. *Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:849-54.
- Mannella C.A., Bonner W.D. Jr. 1975. *Biochemical characteristics of the outer membrane of plant mitochondria*. *Biochim Biophys Acta* 413:213-225.
- Mannella C.A. 1982. *Structure of the outer mitochondrial membrane: ordered arrays of pore like subunits in outer-membrane fractions from Neurospora Crassa mitochondria*. *J Cell Biol* 94:680-687.

- Mannella C.A., Marko M., Penczek P., Barnard D., Frank J. 1994. *The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope.* Microsc Res Tech 27:278-283.
- Mannella C.A. 1997. *Minireview: on the structure and gating mechanism of the mitochondrial channel, VDAC.* J Bioenerg Biomembr 29:525-31.
- Mathieu-Costello O., Suarez R.K., Hochachka P.W. 1992. *Capillary-to-fiber geometry and mitochondrial density in hummingbird flight muscle.* J Am Coll Cardiol 27:140-5.
- Marban E., Rink T.J., Tsien R.W., Tsien R.Y. 1980. *Free calcium in heart muscle at rest and during contraction measured with Ca²⁺-sensitive microelectrodes.* Nature 286:845-50
- Martonosi A.N., Pikula S. 2003. *The network of calcium regulation in muscle.* Acta Biochim Pol 50:1-30.
- Mavroidis M., Capetanaki Y. 2002. *Extensive induction of important mediators of fibrosis and dystrophic calcification in desmin-deficient cardiomyopathy.* Am J Pathol 160:943-52.
- McCormack J.G., Denton R.M. 1984. *Role of Ca²⁺ ions in the regulation of intramitochondrial metabolism in rat heart. Evidence from studies with isolated mitochondria that adrenaline activates the pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes by increasing the intramitochondrial concentration of Ca²⁺.* Biochem J 218:235-47.
- McCormack J.G., Denton R.M. 1990. *The role of mitochondrial Ca²⁺ transport and matrix Ca²⁺ in signal transduction in mammalian tissues.* Biochim Biophys Acta 1018:287-91.
- McCormack J.G., Halestrap A.P., and Denton R.M. 1990. *Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism.* Physiol. Rev. 70:391-425.
- McGilvery R.W., Murray T.W. 1974. *Calculated equilibria of phosphocreatine and adenosine phosphates during utilization of high energy phosphate by muscle.* J Biol Chem 249:5845-50.
- Melki R., Carlier M.F., Pantaloni D. 1990. *Direct evidence for GTP and GDP-Pi intermediates in microtubule assembly.* Biochemistry 29:8921-32.
- Mercier JG, Hokanson JF, Brooks GA. 1995. *Effects of cyclosporine A on skeletal muscle mitochondrial respiration and endurance time in rats.* Am J Respir Crit Care Med 151:1532-1536.
- Messerli J.M., Perriard J.C. 1995. *Three-dimensional analysis and visualization of myofibrillogenesis in adult cardiomyocytes by confocal microscopy.* Microsc Res Tech 30:521-30.
- Meyer R.A., Sweeney H.L., Kushmerick M.J. 1984. *A simple analysis of the "phosphocreatine shuttle".* Am J Physiol 246:C365-77.
- Meyer T., Holowka D., Stryer L. 1988. *Highly cooperative opening of calcium channels by inositol 1,4,5-trisphosphate.* Science 240:653-6.
- Milner D.J., Mavroidis M., Weisleder N., Capetanaki Y. 2000. *Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function.* J Cell Biol 150:1283-98.
- Minajeva A., Ventura-Clapier R., Veksler V. 1996. *Ca²⁺ uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum ATPase in situ strongly depends on bound creatine kinase.* Pflugers Arch 432:904-12.

- Minajeva A., Kaasik A., Paju K., Seppet E., Lompre A.M., Veksler V., Ventura-Clapier R. 1997. *Sarcoplasmic reticulum function in determining atrioventricular contractile differences in rat heart.* Am J Physiol 273:H2498-507.
- Mitchell P. 1961. *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism.* Nature 191:144-8.
- Modzy A.M. and Shaw J. M. 2003. *A fuzzy mitochondrial fusion apparatus comes into focus.* Nat Rev Mol Cell Biol 4:468-478.
- Moss R.L., Fitzsimons D.P. 2002. *Frank-Starling relationship: long on importance, short on mechanism.* Circ Res 90:11-3.
- Muhlebach S.M., Gross M., Wirz T., Wallimann T., Perriard J.C., Wyss M. 1994. *Sequence homology and structure predictions of the creatine kinase isoenzymes.* Mol Cell Biochem 133-134:245-62.
- Muller M., Moser R., Cheneval D., Carafoli E. 1985. *Cardiolipin is the membrane receptor for mitochondrial creatine phosphokinase.* J Biol Chem 260:3839-43.
- Munoz-Marmol A.M., Strasser G., Isamat M., Coulombe P.A., Yang Y., Roca X., Vela E., Mate J.L., Coll J., Fernandez-Figueras M.T., Navas-Palacios J.J., Ariza A., Fuchs E. 1998. *A dysfunctional desmin mutation in a patient with severe generalized myopathy.* Proc Natl Acad Sci U S A 95:11312-7.

N

- Nakashima R.A. 1989. *Hexokinase-binding properties of the mitochondrial VDAC protein: inhibition by DCCD and location of putative DCCD-binding sites.* J Bioenerg Biomembr 21:461-70.
- Neely J.R., Liebermeister H., Battersby E.J., Morgan H.E. 1967. *Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart.* Am J Physiol 212:804-14.
- Niggli E. 1999a. *Ca²⁺ sparks in cardiac muscle: Is there life without them?.* News Physiol Sci. 14:129-134.
- Niggli E. 1999b. *Localized intracellular calcium signaling in muscle: calcium sparks and calcium quarks.* Annu Rev Physiol 61:311-35.
- Noji H., Yasuda R., Yoshida M., Kinoshita K.Jr. 1997. *Direct observation of the rotation of F₁-ATPase.* Nature Review 386:299-302.

O

- Oakley B.R. 1995. *Cell biology. A nice ring to the centrosome.* Nature 378:555-6.
- Ogata T., Yamasaki Y. 1985. *Scanning electron-microscopic studies on the three-dimensional structure of mitochondria in the mammalian red, white and intermediate muscle fibers.* Cell Tissue Res 241:251-6.

Ogata T., Yamasaki Y. 1997. *Ultra-high-resolution scanning electron microscopy of mitochondria and sarcoplasmic reticulum arrangement in human red, white, and intermediate muscle fibers*. Anat Rec 248:214-23.

Olmsted J.B. 1986. *Microtubule-associated proteins*. Annu Rev Cell Biol 2:421-57.

Olmsted J.B. 1991. *Non-motor microtubule-associated proteins*. Curr Opin Cell Biol 3:52-8.

Ouhabi R., Boue-Grabot M., Mazat J.P. 1994. *ATP synthesis in permeabilized cells : assesment of the ATP/O ratio in situ*. In E. Gnaigner, F.N. Gellerich, M. Wyss (eds). Modern Trends in Biothermokinetics, Innsbruck University Press:141-144.

Opie L.H. 1984. *The Heart. Physiology, metabolism, pharmacology, therapy*. Grune and Stratton LTD London.

Opie L.H. 1998. *The Heart. Physiology, from cell to circulation*. Lipincott-Raven publishers, Philadelphia.

Ostlund A.K., Gohring U., Krause J., Brdiczka D. 1983. *The binding of glycerol kinase to the outer membrane of rat liver mitochondria: its importance in metabolic regulation*. Biochem Med 30:231-45.

P

Palmer B.M., Valent S., Holder E.L., Weinberger H.D., Bies R.D. 1998. *Microtubules modulate cardiomyocyte beta-adrenergic response in cardiac hypertrophy*. Am J Physiol 275:H1707-16.

Park K.Y., Dalakas M.C., Goebel H.H., Ferrans V.J., Semino-Mora C., Litvak S., Takeda K., Goldfarb L.G. 2000. *Desmin splice variants causing cardiac and skeletal myopathy*. J Med Genet 37:851-7.

Payne R.M., Strauss A.W. 1994. *Expression of the mitochondrial creatine kinase genes*. Mol Cell Biochem 133-134:235-43.

Pebay-Peyroula E., Dahout-Gonzalez C., Kahn R., Trezeguet V, Lauquin G.J-M., Brandolin G. 2003. *Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside*. Nature 426:39-44.

Penman S. 1995. *Rethinking cell structure*. Proc Natl Acad Sci U S A 92:5251-7.

Perkins G.A., Frey T.G. 2000. *Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy*. Micron 31:97-111.

Pette D. and Staron R.S. 1990. *Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers*. Biochem Pharmacol 116:1-76.

Peuker, H., Conjard, A., and Pette, D. 1998. *Alpha-cardiac-like myosin heavy chain as an intermediate between MHCIIa and MHCI beta in transforming rabbit muscle*. Am.J.Physiol 274:C595-602.

Pinet C, Scillia P, Cassart M, Lamotte M, Knoop C, Mélot C, Estenne M. 2004. *Preferential reduction of quadriceps over respiratory muscle strength and bulk after lung transplantation for cystic fibrosis*. Thorax 59:783-789.

Pitcher J.A., Hall R.A., Daaka Y., Zhang J., Ferguson S.S., Hester S., Miller S., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Barak L.S. 1998. *The G protein-coupled receptor kinase 2 is a microtubule-associated protein kinase that phosphorylates tubulin.* J Biol Chem 273:12316-24.

Pouw E.M., Schols A.M.W.J., Van Der Vusse G.J., Wouters E.F.M. 1998. *Elevated inosine monophosphate levels in resting muscle of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Crit Care Med 157:453-457.

R

Raman N., Atkinson S.J. 1999. *Rho controls actin cytoskeletal assembly in renal epithelial cells during ATP depletion and recovery.* Am J Physiol 276:C1312-24.

Rappaport L., Samuel J.L. 1988. *Microtubules in cardiac myocytes.* Int Rev Cytol 113:101-43.

Rappaport L., Oliviero P., Samuel J.L. 1998. *Cytoskeleton and mitochondrial morphology and function.* Mol Cell Biochem 184:101-5.

Rasenick M.M., Stein P.J., Bitensky M.W. 1981. *The regulatory subunit of adenylate cyclase interacts with cytoskeletal components.* Nature 294:560-2.

Rasenick M.M., Wang N., Yan K. 1990. *Specific associations between tubulin and G proteins: participation of cytoskeletal elements in cellular signal transduction.* Adv Second Messenger Phosphoprotein Res 24:381-6.

Ribera F., N'Guessan B., Zoll J., Fortin D., Serrurier B., Mettauer B., Bigard X., Ventura-Clapier R., Lampert E. 2003. *Mitochondrial electron transport chain function is enhanced in inspiratory muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Crit Care Med 167:873-9.

Richardson RS, Leek BT, Gavin TP, Haseler LG, Mudaliar SRD, Henry R, Mathieu-Costello O, Wagner PD. 2004. *Reduced mechanical efficiency in chronic obstructive pulmonary disease but normal peak VO₂ with small muscle mass exercise.* Am J Respir Crit Care Med 169:89-96.

Rojo M., Hovius R., Demel R.A., Nicolay K., Wallimann T. 1991. *Mitochondrial creatine kinase mediates contact formation between mitochondrial membranes.* J Biol Chem 266:20290-5.

Romashko D.N., Marban E., O'Rourke B. 1998. *Subcellular metabolic transients and mitochondrial redox waves in heart cells.* Proc Natl Acad Sci U S A 95:1618-23.

Rothen-Rutishauser B.M., Ehler E., Perriard E., Messerli J.M., Perriard J.C. 1998. *Different behaviour of the non-sarcomeric cytoskeleton in neonatal and adult rat cardiomyocytes.* J Mol Cell Cardiol 30:19-31.

Rossi A.M., Eppenberger H.M., Volpe P., Cotrufo R., Wallimann T. 1990. *Muscle-type MM creatine kinase is specifically bound to sarcoplasmic reticulum and can support Ca²⁺ uptake and regulate local ATP/ADP ratios.* J Biol Chem 265:5258-66.

Rossi A., Kay L., Saks V. 1998. *Early ischemia-induced alterations of the outer mitochondrial membrane and the intermembrane space: a potential cause for altered energy transfer in cardiac muscle?* Mol Cell Biochem 184:401-8.

S

Sadoshima J., Takahashi T., Jahn L., Izumo S. 1992. *Roles of mechano-sensitive ion channels, cytoskeleton, and contractile activity in stretch-induced immediate-early gene expression and hypertrophy of cardiac myocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A 89:9905-9.

Saetersdal T., Greve G., Dalen H. 1990. *Associations between beta-tubulin and mitochondria in adult isolated heart myocytes as shown by immunofluorescence and immunoelectron microscopy.* Histochemistry 95:1-10.

Safiulina D., Kaasik A., Seppet E., Peet N., Zharkovsky A., Seppet E. 2004. *Method for in situ detection of the mitochondrial function in neurons.* J Neurosci Methods 137:87-95.

Saks V.A., Chernousova G.B., Voronkov I.I., Smirnov V.N., Chazov E.I. 1974. *Study of energy transport mechanism in myocardial cells.* Circ Res 35:138-49.

Saks V.A., Chernousova G.B., Gukovsky D.E., Smirnov V.N., Chazov E.I. 1975. *Studies of energy transport in heart cells. Mitochondrial isoenzyme of creatine phosphokinase: kinetic properties and regulatory action of Mg²⁺ ions.* Eur J Biochem 57:273-90.

Saks V.A., Lipina N.V., Chernousova G.B., Sharov V.G., Smirnov V.N., Chazov E.I., Grosse R. 1976. *The functional coupling between MM isozyme of creatine phosphokinase (EC 2.7.3.2.) and MgATPase of myofibrils and (Na, K)ATPase of plasma membrane in heart cells* Biokhimiia 41:2099-109.

Saks V.A., Seppet E.K., Liulina N.V. 1977. *A comparative study of the role of creatine phosphokinase isoenzymes in energy metabolism of skeletal and heart muscle.* Biokhimiia 42:579-88.

Saks V.A., Ventura-Clapier R., Khuchua Z.A., Preobrazhensky A.N., Emelin I.V. 1984. *Creatine kinase in regulation of heart function and metabolism. I. Further evidence for compartmentation of adenine nucleotides in cardiac myofibrillar and sarcolemmal coupled ATPase-creatine kinase systems.* Biochim Biophys Acta 803:254-64.

Saks V.A., Kuznetsov A.V., Kupriyanov V.V., Miceli M.V., Jacobus W.E. 1985. *Creatine kinase of rat heart mitochondria. The demonstration of functional coupling to oxidative phosphorylation in an inner membrane-matrix preparation.* J Biol Chem 260:7757-64.

Saks V.A., Khuchua Z.A., Kuznetsov A.V. 1987. *Specific inhibition of ATP-ADP translocase in cardiac mitoplasts by antibodies against mitochondrial creatine kinase.* Biochim Biophys Acta 891:138-44.

Saks V.A., Kapelko V.I., Kupriyanov V.V., Kuznetsov A.V., Lakomkin V.L., Veksler V.I., Sharov V.G., Javadov S.A., Seppet E.K., Kairane C. 1989. *Quantitative evaluation of relationship between*

cardiac energy metabolism and post-ischemic recovery of contractile function. J Mol Cell Cardiol 21:67-78.

Saks V.A., Belikova Y.O., Kuznetsov A.V. 1991. *In vivo regulation of mitochondrial respiration in cardiomyocytes: specific restrictions for intracellular diffusion of ADP.* Biochim Biophys Acta 1074:302-11.

Saks V.A., Vasil'eva E., Belikova Yu.O., Kuznetsov A.V., Lyapina S., Petrova L., Perov N.A. 1993. *Retarded diffusion of ADP in cardiomyocytes: possible role of mitochondrial outer membrane and creatine kinase in cellular regulation of oxidative phosphorylation.* Biochim Biophys Acta 1144:134-48.

Saks V.A., Khuchua Z.A., Vasilyeva E.V., Belikova O.Yu, Kuznetsov A.V. 1994. *Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration--a synthesis.* Mol Cell Biochem 133-134:155-92.

Saks V.A., Kuznetsov A.V., Khuchua Z.A., Vasilyeva E.V., Belikova J.O., Kesvatera T., Tiivel T. 1995a. *Control of cellular respiration in vivo by mitochondrial outer membrane and by creatine kinase. A new speculative hypothesis: possible involvement of mitochondrial-cytoskeleton interactions.* J Mol Cell Cardiol 27:625-45.

Saks VA, Kay L., Rossi A., Toompuu M., Utno L., Ratsep I., Sulling T. 1995b. *A novel method for evaluation of efficiency of heart preservation and intraoperative protection by analysis of the respiration of skinned cardiac fibers.* Heart Surgery 197-212.

Saks V.A., Ventura-Clapier R., Aliev M.K. 1996. *Metabolic control and metabolic capacity: two aspects of creatine kinase functioning in the cells.* Biochim Biophys Acta 1274:81-8.

Saks V., Dos Santos P., Gellerich F.N., Diolet P. 1998a. *Quantitative studies of enzyme-substrate compartmentation, functional coupling and metabolic channelling in muscle cells.* Mol Cell Biochem 184:291-307.

Saks V.A., Veksler V.I., Kuznetsov A.V., Kay L., Sikk P., Tiivel T., Tranqui L., Olivares J., Winkler K., Wiedemann F., Kunz W.S. 1998b. *Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo.* Mol Cell Biochem 184:81-100.

Saks V.A., Kongas O., Vendelin M., Kay L. 2000. *Role of the creatine/phosphocreatine system in the regulation of mitochondrial respiration.* Acta Physiol Scand 168:635-41.

Saks V.A., Kaambre T., Sikk P., Eimre M., Orlova E., Paju K., Piirsoo A., Appaix F., Kay L., Regitz-Zagrosek V., Fleck E., Seppet E. 2001. *Intracellular energetic units in red muscle cells.* Biochem J 356:643-57.

Saks V, Appaix F., Usson Y., Guerrero K., Olivares J., Seppet E., Aliev M., Margreiter R. and Kuznetsov A. 2003. *Localized control of oxidative phosphorylation within intracellular energetic units in heart cells: a possible solution of some old problems.* vol. Myocardial ischemia, éditeur N. Dhalla, Kluwer, Academic Publishers, New York. pp.265-284

- Saks V.A., Kuznetsov A.V., Vendelin M., Guerrero K., Kay L., Seppet E.K. 2004. *Functional coupling as a basic mechanism of feedback regulation of cardiac energy metabolism*. Mol Cell Biochem 256-257:185-99.
- Saltin B., Henriksson J., Nygaard E., Andersen P., Jansson E. 1977. *Fiber types and metabolic potentials of skeletal muscles in sedentary man and endurance runners*. Ann N Y Acad Sci 301:3-29.
- Saltin B. and Gollnick P.D. 1983. *Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance*. In Peachy et al. (Eds) Handbook of Physiology - Section 10 : Skeletal muscle. pp 555-631.
- Sampson M.J., Decker W.K., Beaudet A.L., Ruitenbeek W., Armstrong D., Hicks M.J., Craigen W.J. 2001. *Immotile sperm and infertility in mice lacking mitochondrial voltage-dependent anion channel type 3*. J Biol Chem 276:39206-12
- Samuel J.L., Corda S., Chassagne C., Rappaport L. 2000. *The extracellular matrix and the cytoskeleton in heart hypertrophy and failure*. Heart Failure Rev 5:239-250.
- Sanchez H, Bigard X, Veksler V, Mettauer B, Lampert E, Lonsdorfer J, Ventura-Clapier R. 2000. *Immunosuppressive treatment affects cardiac and skeletal muscle mitochondria by the toxic effect of vehicle*. J Mol Cell Cardiol 32:323-331.
- Sanchez H, Zoll J, Bigard X, Veksler V, Mettauer B, Lampert E, Lonsdorfer J, Ventura-Clapier R. 2001. *Effect of cyclosporin A and its vehicle on cardiac and skeletal muscle mitochondria: relationship to efficacy of the respiratory chain*. Br J Pharmacol 133:781-788.
- Saraste M. 1999. *Oxidative phosphorylation at the fin de siecle*. Science 283:1488-93.
- Savabi F. 1994. *Interaction of creatine kinase and adenylate kinase systems in muscle cells*. Mol Cell Biochem 133-134:145-52.
- Schaub M.C., Brunner U.T., Von Schulthess C., Neidhart M., Baumann H. 1989. *Adaptation of contractile proteins in human heart and skeletal muscles*. Biomed Biochim Acta 48:S306-12.
- Scheffler, I.E. *Mitochondria*. 1999, NewYork: Wiley-Liss, Inc. 367.
- Schiaffino, S. and Reggiani, C. 1994. *Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle*. J.Appl.Physiol 77:493-501.
- Schlattner U., Gehring F., Vernoux N., Tokarska-Schlattner M., Neumann D., Marcillat O., Vial C., Wallimann T. 2004. *C-terminal lysines determine phospholipid interaction of sarcomeric mitochondrial creatine kinase*. J Biol Chem 279:24334-42.
- Schnyder T., Rojo M., Furter R., Wallimann T. 1994. *The structure of mitochondrial creatine kinase and its membrane binding properties*. Mol Cell Biochem 133-134:115-23.
- Schoenfeld T.A., Obar R.A. 1994. *Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system*. Int Rev Cytol 151:67-137.
- Scholte H.R. 1973. *The separation and enzymatic characterization of inner and outer membranes of rat-heart mitochondria*. Biochim Biophys Acta 330:283-93.

- Schwarzer C., Barnikol-Watanabe S., Thinnes F.P., Hilschmann N. 2002. *Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) interacts with the dynein light chain Tctex1 and the heat-shock protein PBP74*. Int J Biochem Cell Biol 34:1059-70.
- Seppet E.K., Kaambre T., Sikk P., Tiivel T., Vija H., Tonkonogi M., Sahlin K., Kay L., Appaix F., Braun U., Eimre M., Saks V.A. 2001. *Functional complexes of mitochondria with Ca,MgATPases of myofibrils and sarcoplasmic reticulum in muscle cells*. Biochim Biophys Acta 1504:379-95.
- Seppet E.K., Eimre M., Andrienko T., Kaambre T., Sikk P., Kuznetsov A.V., Saks V. 2004. *Studies of mitochondrial respiration in muscle cells in situ: use and misuse of experimental evidence in mathematical modelling*. Mol Cell Biochem 256-257:219-27.
- Sesaki H. and Jensen R.E. 1999. *Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape*. J Cell Biol 147, 699-706.
- Sesaki H. and Jensen R.E. 2001. *UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion*. J Cell Biol 152:1123-1134.
- Severs N.J., Slade A.M., Powell T., Twist V.W., Jones G.E. 1985. *Morphometric analysis of the isolated calcium-tolerant cardiac myocyte. Organelle volumes, sarcomere length, plasma membrane surface folds, and intramembrane particle density and distribution*. Cell Tissue Res 240:159-68.
- Sharma A., Singh M. 2000a. *Possible mechanism of cardioprotective effect of angiotensin preconditioning in isolated rat heart*. Eur J Pharmacol 406:85-92.
- Sharma A., Singh M. 2000b. *Possible mechanism of cardioprotective effect of ischaemic preconditioning in isolated rat heart*. Pharmacol Res 41:635-40.
- Shimizu J., Todaka K., Burkhoff D. 2002. *Load dependence of ventricular performance explained by model of calcium-myofilament interactions*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 282:H1081-91.
- Sjoberg G., Saavedra-Matiz C.A., Rosen D.R., Wijsman E.M., Borg K., Horowitz S.H., Sejersen T. 1999. *A missense mutation in the desmin rod domain is associated with autosomal dominant distal myopathy, and exerts a dominant negative effect on filament formation*. Hum Mol Genet 8:2191-8.
- Skobel E., Kammermeier H. 1997. *Relation between enzyme release and irreversible cell injury of the heart under the influence of cytoskeleton modulating agents*. Biochim Biophys Acta 1362:128-34.
- Skulachev V.P. 2001. *Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables*. Trends Biochem Sci 26:23-29.
- Smirnova E., Griparic L., Shurland E.L. and van der Bliek A.M. 2001. *Dynamin –related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells*. Mol. Cell 12:2245-2256.
- Solaro R.J., Rarick H.M. 1998. *Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments*. Circ Res 83:471-80.
- Sommer J.R. 1995. *Comparative anatomy: in praise of a powerful approach to elucidate mechanisms translating cardiac excitation into purposeful contraction*. J Mol Cell Cardiol. 27:19-35.

Spindler M., Niebler R., Remkes H., Horn M., Lanz T., Neubauer S. 2002. *Mitochondrial creatine kinase is critically necessary for normal myocardial high-energy phosphate metabolism*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 283:H680-7.

Starling E.H. and Visscher M.B. 1927. *The regulation of the output of the heart*. Jopurnal of Physiology, Cambridge 62:243-261.

Staron R. S. and Pette D. 1986. *Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in rabbit muscle fibers*. Histochemistry 86:19-23.

St Clair D., Blackwood D., Muir W., Carothers A., Walker M., Spowart G., Gosden C. and Evans H.J. 1990. *Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness*. Lancet 336: 13-16.

Stolz M., Wallimann T. 1998. *Myofibrillar interaction of cytosolic creatine kinase (CK) isoenzymes: allocation of N-terminal binding epitope in MM-CK and BB-CK*. J Cell Sci 111:1207-16.

[Stromer MH](#). 1998. *The cytoskeleton in skeletal, cardiac and smooth muscle cells*. Histol Histopathol. 13(1):283-91.

Sugi H., Akimoto T., Sutoh K., Chaen S., Oishi N., Suzuki S. 1997. *Dynamic electron microscopy of ATP-induced myosin head movement in living muscle thick filaments*. Proc Natl Acad Sci U S A 94:4378-82.

Sweeney H.L. 1994. *The importance of the creatine kinase reaction: the concept of metabolic capacitance*. Med Sci Sports Exerc 26:30-6.

T

Tagawa H., Koide M., Sato H., Zile M.R., Carabello B.A., Cooper G. 4th. 1998. *Cytoskeletal role in the transition from compensated to decompensated hypertrophy during adult canine left ventricular pressure overloading*. Circ Res 82:751-61.

Takahashi M., Tsutsui H., Kinugawa S., Igarashi-Saito K., Yamamoto S., Yamamoto M., Tagawa H., Imanaka-Yoshida K., Egashira K., Takeshita A. 1998. *Role of microtubules in the contractile dysfunction of myocytes from tachycardia-induced dilated cardiomyopathy*. J Mol Cell Cardiol 30:1047-57.

Terada H. 1990. *Uncouplers of oxidative phosphorylation*. Environ Health Perspect 87:213-218.

Territo P.R., Mootha V.K, French S.A., and Balaban R.S. 2000. *Ca²⁺ activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F₀/F₁-ATPase*. Am. J. Physiol. Cell Physiol 278:C423–C435.

Territo P.R, French S.A., Dunleavy M.C., Evans F.J., Balaban R.S. 2001. *Calcium activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: rapid kinetics of mVO₂, NADH, AND light scattering*. J Biol Chem 276:2586-99.

[Thinnes F.P.](#), [Gotz H.](#), [Kayser H.](#), [Benz R.](#), [Schmidt W.E.](#), [Kratzin H.D.](#), [Hilschmann N.](#) 1990.

Identification of human porins. I. Purification of a porin from human B-lymphocytes (Porin 31HL) and the topochemical proof of its expression on the plasmalemma of the progenitor cell. Biol Chem Hoppe Seyler. 370(12):1253-64.

Tirdel GB, Girgis R, Fishman RS, Theodore J. 1998. *Metabolic myopathy as a cause of the exercise limitation in lung transplant recipients.* J Heart Lung Transplant 17:1231-1237.

Tiivel T., Kadaya L., Kuznetsov A., Kaambre T., Peet N., Sikk P., Braun U., Ventura-Clapier R., Saks V., Seppet E.K. 2000. *Developmental changes in regulation of mitochondrial respiration by ADP and creatine in rat heart in vivo.* Mol Cell Biochem 208:119-28.

Tonkonogi M., Harris B., Sahlin K. 1998. *Mitochondrial oxydative function in human saponin-skinned muscle fibres: effects of prolonged exercise.* J Physiol 510:279-86.

Tonkonogi M., Walsh B., Svensson M., Sahlin K. 2000. *Mitochondrial function and antioxidative defence in human muscle: effects of endurance training and oxidative stress.* J Physiol 528:379-88.

Tonkonogi M., Sahlin K. 2002. *Physical exercise and mitochondrial function in human skeletal muscle.* Exerc Sport Sci Rev 30:129-37.

Towbin J.A., Minter M., Brdiczka D., Adams V., De Pinto V., Palmieri F., McCabe E.R. 1989. *Demonstration and characterization of human cardiac porin: a voltage-dependent channel involved in adenine nucleotide movement across the outer mitochondrial membrane.* Biochem Med Metab Biol 42:161-9.

Trask R.V., Billadello J.J. 1990. *Tissue-specific distribution and developmental regulation of M and B creatine kinase mRNAs.* Biochim Biophys Acta 1049:182-8.

Trulock EP. 1997. *Lung transplantation.* Am J Respir Crit Care Med 155:789-818.

Tsutsui H., Tagawa H., Kent R.L., McCollam P.L., Ishihara K., Nagatsu M., Cooper G. 4th. 1994. *Role of microtubules in contractile dysfunction of hypertrophied cardiocytes.* Circulation 90:533-55.

V

van der Blik A.M. and Meyerowitz E.M. 1991. *Dynamin-like protein encoded by the drosophila shibire gene associated with vesicular traffic.* Nature 351, 411-414.

van der Blik A.M. 2000. *A mitochondrial division apparatus takes shape.* J Cell Biol 151, F1-F4.

van Deursen J., Heerschap A., Oerlemans F., Ruitenbeek W., Jap P., ter Laak H., Wieringa B. 1993. *Skeletal muscles of mice deficient in muscle creatine kinase lack burst activity.* Cell 74:621-31.

Vander Heiden M.G., Chandel N.S., Li X.X., Schumacker P.T., Colombini M., Thompson C.B. 2000. *Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival.* Proc Natl Acad Sci U S A 97:4666-71.

Veksler V.I., Kuznetsov A.V., Sharov V.G., Kapelko V.I., Saks V.A. 1987. *Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers.* Biochim Biophys Acta 892:191-6.

- Veksler V.I., Kuznetsov A.V., Anflous K., Mateo P., van Deursen J., Wieringa B., Ventura-Clapier R. 1995. *Muscle creatine kinase-deficient mice. II. Cardiac and skeletal muscles exhibit tissue-specific adaptation of the mitochondrial function.* J Biol Chem 270:19921-9.
- Vendelin M., Kongas O., Saks V. 2000. *Regulation of mitochondrial respiration in heart cells analyzed by reaction-diffusion model of energy transfer.* Am J Physiol Cell Physiol 278:C747-64.
- Vendelin M., Eimre M., Seppet E., Peet N., Andrienko T., Lemba M., Engelbrecht J., Seppet E.K., Saks V.A. 2004a. *Intracellular diffusion of adenosine phosphates is locally restricted in cardiac muscle.* Mol Cell Biochem 256-257:229-41.
- Vendelin M., Lemba M. and Saks V. 2004b. *Analysis of functional coupling: mitochondrial creatine kinase and adenine nucleotide translocase.* Biophys J 87:696-713.
- Vendelin M., Beraud N., Guerrero K., Andrienko T., Kuznetsov A.V., Olivares J., Kay L., Saks V.A. 2005. *Mitochondrial regular arrangement in muscle cells: a "crystal-like" pattern.* Am J Physiol Cell Physiol 288:C757-67.
- Ventura-Clapier R., Veksler V., Hoerter J.A. 1994. *Myofibrillar creatine kinase and cardiac contraction.* Mol Cell Biochem 133-134:125-44.
- Ventura-Clapier R., Kaasik A., Veksler V. 2004. *Structural and functional adaptations of striated muscles to CK deficiency.* Mol Cell Biochem 256-257:29-41.
- Voloshchuk S.G., Belikova Y.O., Klyushnik T.P., Benevolensky D.S., Saks V.A. 1998. *Comparative study of respiration kinetics and protein composition of skinned fibers from various types of rat muscle.* Biochemistry 63:155-8.
- Vyssokikh M., Brdiczka D. 2004. *VDAC and peripheral channelling complexes in health and disease.* Mol Cell Biochem 256:117-124.

W

- Wallimann T., Schlosser T., Eppenberger H.M. 1984. *Function of M-line-bound creatine kinase as intramyofibrillar ATP regenerator at the receiving end of the phosphorylcreatine shuttle in muscle.* J Biol Chem 259:5238-46.
- Wallimann T., Wyss M., Brdiczka D., Nicolay K., Eppenberger H.M. 1992. *Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis.* Biochem J 281:21-40.
- Wallimann T., Hemmer W. 1994. *Creatine kinase in non-muscle tissues and cells.* Mol Cell Biochem 133-134:193-220.
- Wallimann T., Dolder M., Schlattner U., Eder M., Hornemann T., Kraft T., Stolz M. 1998. *Creatine kinase: an enzyme with a central role in cellular energy metabolism.* MAGMA 6:116-9.

- Walsh B., Tonkonogi M., Sahlin K. 2001a. *Effect of endurance training on oxidative and antioxidative function in human permeabilized muscle fibres*. Pflugers Arch 442:420-5.
- Walsh B., Tonkonogi M., Soderlund K., Hultman E., Saks V., Sahlin K. 2001b. *The role of phosphorylcreatine and creatine in the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle*. J Physiol 537:971-8.
- Wan B., Doumen C., Duszynski J., Salama G., Vary T.C., LaNoue K.F. 1993. *Effects of cardiac work on electrical potential gradient across mitochondrial membrane in perfused rat hearts*. Am J Physiol 265:H453-60.
- Wang H., Oster G. 1998. *Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase*. Nature 396:279-82.
- Wang N., Butler J.P., Ingber D.E. 1993. *Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton*. Science 260:1124-7.
- Wang N., Ingber D.E. 1994. *Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape, and mechanical tension*. Biophys J 66:2181-9.
- Wang SQ., Wei C., Zhao G., Brochet D.X.P., Shen J., Song LS., Wang W., Yang D., Cheng H. 2004. *Imaging microdomains Ca^{2+} in cardiac muscle*. Circ Res 94:1011-1022.
- Wang X., Osinska H., Dorn G.W. 2nd, Nieman M., Lorenz J.N., Gerdes A.M., Witt S., Kimball T., Gulick J., Robbins J. 2001. *Mouse model of desmin-related cardiomyopathy*. Circulation 103:2402-7.
- Walsh B., Tonkonogi M., Soderlund K., Hultman E., Saks V., Sahlin K. 2001. *The role of phosphorylcreatine and creatine in the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle*. J Physiol 537:971-8.
- Watkins S.C., Samuel J.L., Marotte F., Bertier-Savalle B., Rappaport L. 1987. *Microtubules and desmin filaments during onset of heart hypertrophy in rat: a double immunoelectron microscope study*. Circ Res 60:327-36.
- Webb B.C., Wilson L. 1980. *Cold-stable microtubules from brain*. Biochemistry 19:1993-2001.
- Wegmann G., Zanolla E., Eppenberger H.M., Wallimann T. 1992. *In situ compartmentation of creatine kinase in intact sarcomeric muscle: the acto-myosin overlap zone as a molecular sieve*. J Muscle Res Cell Motil 13:420-35.
- Weibel E.R., Taylor C.R., Hoppeler H., 1991. *The concept of symmorphosis: a testable hypothesis of structure-function relationship*. Proc Natl Acad Sci USA 88:10357-61.
- Weisleder N., Soumaka E., Abbasi S., Taegtmeier H., Capetanaki Y. 2004. *Cardiomyocyte-specific desmin rescue of desmin null cardiomyopathy excludes vascular involvement*. J Mol Cell Cardiol 36:121-8.
- Weiss J.N., Korge P. 2001. *The cytoplasm: no longer a well-mixed bag*. Circ Res 89:108-10.
- West I.C. 1997. *Ligand conduction and the gated-pore mechanism of transmembrane transport*. Biochim Biophys Acta 1331:213-34.
- Westerhoff H., Van Dam K. 1987. *Thermodynamics and control of biological free energy transduction*. Elsevier Amsterdam. 1-568.

Westermann B. 2002. *Merging mitochondria matters: cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion*. EMBO Rep 3, 527-531.

Wibo M., Bravo G., Godfraind T. 1991. *Postnatal maturation of excitation-contraction coupling in rat ventricle in relation to the subcellular localization and surface density of 1,4-dihydropyridine and ryanodine receptors*. Circ Res 68:662-73.

Wilbur K., Makowsky M. 2004. *Colchicine myotoxicity: case reports and literature review*. Pharmacotherapy 24:1784-92.

Williams TJ, Patterson GA, McClean PA, Zamel N, Maurer JR. 1992. *Maximal exercise testing in single and double lung transplant recipients*. Am Rev Respir Dis 145:101-105.

Williamson J.R., Ford C., Illingworth J., Safer B. 1976. *Coordination of citric acid cycle activity with electron transport flux*. Circ Res 38:139-51.

Winkelbach H., Walter G., Morys-Wortmann C., Paetzold G., Hesse D., Zimmermann B., Florke H., Reymann S., Stadtmüller U., Thinnies F.P. 1994. *Studies on human porin. XII. Eight monoclonal mouse anti-"porin 31HL" antibodies discriminate type 1 and type 2 mammalian porin channels/VDACs in western blotting and enzyme-linked immunosorbent assays*. Biochem Med Metab Biol 52:120-7.

Wiseman R.W., Jeneson J.A.L., Kushmerick M.J. 1996. *Why is the sensitivity of mitochondria to ADP over tenfold lower in permeabilized fibers in vivo?*. Biothermokinetics of the living cell. Biothermokinetics Press, Amsterdam, pp 124-127.

Wu S., Sampson M.J., Decker W.K., Craigen W.J. 1994. *Each mammalian mitochondrial outer membrane porin protein is dispensable: effects on cellular respiration*. Biochim Biophys Acta 1452:68-78.

Wyss M., Wallimann T. 1992. *Metabolite channelling in aerobic energy metabolism*. J Theor Biol 158:129-32.

Wyss M., Smeitink J., Wevers R.A., Wallimann T. 1992. *Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism*. Biochim Biophys Acta 1102:119-66.

Wyss M., Kaddurah-Daouk R. 2000. *Creatine and creatinine metabolism*. Physiol Rev 80:1107-213.

X

Xu X., Decker W., Sampson M.J., Craigen W.J., Colombini M. 1999. *Mouse VDAC isoforms expressed in yeast: channel properties and their roles in mitochondrial outer membrane permeability*. J Membr Biol 170:89-102.

Y

Yaffe M.P. 1999. *The machinery of mitochondrial inheritance and behavior*. Science 283:1493-7.

Yagi K., Mase R. 1962. *Coupled reaction of creatine kinase and myosin A-adenosine triphosphatase.* J Biol Chem 237:397-403.

Yamashita K., Yoshioka T. 1991. *Profiles of creatine kinase isoenzyme compositions in single muscle fibres of different types.* J Muscle Res Cell Motil 12:37-44.

Yang X., Salas P.J., Pham T.V., Wasserlauf B.J., Smets M.J., Myerburg R.J., Gelband H., Hoffman B.F., Bassett A.L. 2002. *Cytoskeletal actin microfilaments and the transient outward potassium current in hypertrophied rat ventriculocytes.* J Physiol. 541:411-21.

Yasuda R., Noji H., Yoshida M., Kinosita K Jr, Itoh H., 2001. *Resolution of distinct rotational substeps by millisecond kinetic analysis of F1-ATPase.* Nature 410:898-904.

Young P., Ferguson C., Banuelos S., Gautel M. 1998. *Molecular structure of the sarcomeric Z-disk: two types of titin interactions lead to an asymmetrical sorting of alpha-actinin.* EMBO J 17:1614-24.

Z

Zeleznikar R.J., Goldberg N.D. 1991. *Kinetics and compartmentation of energy metabolism in intact skeletal muscle determined from ¹⁸O labeling of metabolite phosphoryls.* J Biol Chem 266:15110-9.

Zoll J., Sanchez H., N'Guessan B., Ribera F., Lampert E., Bigard X, Serrurier B., Fortin D., Geny B., Veksler V., Ventura-Clapier R., Mettauer B. 2002. *Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle.* J Physiol 543:191-200.

Zoll J., Koulmann N., Bahi L., Ventura-Clapier R., Bigard X. 2003a. *Quantitative and qualitative adaptation of skeletal muscle mitochondria to increased physical activity.* J Cell Physiol 194:186-93.

Zoll J., N'Guessan B., Ribera F., Lampert E., Fortin D., Veksler V., Bigard X., Geny B., Lonsdorfer J., Ventura-Clapier R., Mettauer B. 2003b. *Preserved response of mitochondrial function to short-term endurance training in skeletal muscle of heart transplant recipients.* J Am Coll Cardiol 42:126-32.

[Zorov D.B.](#), [Filburn C.R.](#), [Klotz L.O.](#), [Zweier J.L.](#), [Sollott S.J.](#) 2000. *Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes.* J Exp Med. 192(7):1001-14.

Zot A.S., Potter J.D. 1987. *Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction.* Annu Rev Biophys Biophys Chem 16:535-59.