



LE STRESS OXYDANT INDUIT PAR VOIE METABOLIQUE (REGIMES ALIMENTAIRES) OU PAR VOIE GAZEUSE (HYPEROXIE) ET EFFET DE LA GLISODIN®

Blandine Garait

► To cite this version:

Blandine Garait. LE STRESS OXYDANT INDUIT PAR VOIE METABOLIQUE (REGIMES ALIMENTAIRES) OU PAR VOIE GAZEUSE (HYPEROXIE) ET EFFET DE LA GLISODIN®. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT : . tel-00120861v2

HAL Id: tel-00120861

<https://theses.hal.science/tel-00120861v2>

Submitted on 18 Dec 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1
SCIENCES-TECHNOLOGIE-SANTE

Année 2006

N°

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
Discipline : Biologie Cellulaire

présentée et soutenue publiquement le 3 novembre 2006

par

Blandine GARAIT

**Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires)
ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®**

Directeur de thèse : Dr. Roland FAVIER

JURY

Docteur Béatrice MORIO	Rapporteur
Professeur Michel RIGOLET	Rapporteur
Professeur Anne-Marie ROUSSEL	Examineur
Monsieur Bernard MONTANARI	Examineur
Professeur Xavier LEVERVE	Président
Docteur Roland FAVIER	Directeur

Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée – EMI0221

SOMMAIRE

Sommaire.....	4
Abreviations	3
Avant-propos	5
INTRODUCTION	7
I. Le Stress oxydant	8
I.1. Différentes formes de radicaux libres de l'oxygène (ros).....	8
I.2. Principale source de radicaux libres : la mitochondrie	9
I.2.1. Chaîne respiratoire mitochondriale	11
I.2.2. Rendement de l'oxydation phosphorylante	13
I.2.3. Production de ROS	16
I.3. Systèmes Anti-oxydants.....	20
I.3.1. Systèmes antioxydants enzymatiques	21
I.3.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques	23
I.4. Dégâts cellulaires	25
I.4.1. Peroxydation lipidique	25
I.4.2. Oxydation des protéines	25
I.4.3. Dommages de l'ADN	26
I.4.4. Activation du pore de transition de perméabilité.	27
II. Les régimes alimentaires	29
II.1. Restriction calorique et rat Lou/C.....	29
II.1.1. Restriction calorique	29
II.1.2. Le rat Lou/C.....	34
II.2. Régime riche en lipides.....	36
II.3. Régime riche en saccharose / fructose	42
III. L'Hyperoxie	46
III.1. Hyperoxie sévère ($O_2 > 90\%$).....	47
III.2. Préconditionnement hyperoxique	50
IV. Supplémentation en antioxydants et GliSODin®	52
IV.1. Supplémentation en antioxydants.....	52
IV.2. GliSODin®	54
V. Orientation du travail.....	57
MATERIEL & METHODES	58
I. Animaux.....	59
I.1. Etude I	59
I.2. Etude II	60
I.3. Etude III	61
II. Dépense énergétique et activité locomotrice	61
III. Préparations des mitochondries isolées	62
III.1. Homogénats de muscle squelettique.....	62
III.2. Homogénats de foie	63
III.3. Isolement des mitochondries	63
IV. Respiration mitochondriale	64
V. Production mitochondriale d' H_2O_2	66

V.1. Mesure avec la sonde acide homovanillique (étude 1).....	66
V.2. Mesure avec la sonde amplex red reagent (étude 2 et 3).....	67
VI. Potentiel de membrane mitochondrial.....	67
VII. Capacité de rétention calcique	68
VIII. Activités enzymatiques sur mitochondries isolées	70
VIII.1. Citrate synthase.....	70
VIII.2. Complexe I (NADH-ubiquinone oxidoreductase roténone-sensible).....	70
VIII.3. Complexe II (succinate-ubiquinone reductase)	71
VIII.4. Complexe IV (Cytochrome c oxydase)	71
IX. Cytochromes de la chaîne respiratoire	72
X. Paramètres du stress oxydant.....	72
X.1. Préparation des homogénats	72
X.2. Peroxydation lipidique (mesure des TBARS)	73
X.3. Oxydation des protéines (mesure des thiols).....	73
X.4. Glutathion	73
X.5. Superoxyde dismutase (SOD)	74
X.6. Glutathion peroxydase (GPx)	74
X.7. Catalase.....	75
XI. Concentration d'ARN d'UCP2 et UCP3 dans le muscle	75
XII. Composition en lipides et en acides gras des membranes mitochondriales.....	76
XII.1. Composition en phospholipides	77
XII.2. Composition en acides gras	77
XIII. Statistiques.....	78
RESULTATS & DISCUSSION	79
Etude I	80
Etude II	96
Etude III.....	118
CONCLUSION GENERALE	136
BIBLIOGRAPHIE.....	139
ANNEXES	159

ABREVIATIONS

$\Delta\psi$	potentiel de membrane
ΔpH	différence de pH de part et d'autre de la membrane mitochondriale
$\Delta\mu$	force protomotrice
AA	antimycine A
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine-5'-diphosphate
AGE	dernier produit de la glycation des protéines (Advanced Glycation End)
AGMI	acide gras monoinsaturé
AGPI	acide gras polyinsaturé
AGS	acide gras saturé
ANT	transporteur des nucléotides adényliques
ARA	acide gras arachidonique
ATP	adénosine-5'-triphosphate
ATPase	F_0 - F_1 ATP synthase
BSA	albumine de sérum bovin
Ca^{2+}	ion calcium
COX	cytochrome c oxydase
CRC	capacité de rétention calcique
Cu/Zn-SOD	superoxyde dismutase aux ions cuivre et zinc
CYP	enzyme cytochrome P450
DAG	diacylglycérol
DNP	2,4-dinitrophénol
$\text{FADH}_2/\text{FAD}^+$	flavine adénine dinucléotide réduite/oxydée
FCCP	p-trifluorométhoxycarbonylcyanide phénylhydrazone
FMN	flavine mononucléotide
GAPDH	glycéraldehyde phosphate déshydrogénase
G6PDH	glucose-6-phosphate déshydrogénase
GPx	glutathion peroxydase
GR	glutathion reductase
GSH/GSSG	glutathion réduit/oxydé

HCl	chlorure d'hydrogène
HSP	protéine de stress (Heat Shock Protein)
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
JATP	flux de synthèse d'ATP
JO ₂	flux de consommation d'oxygène
LC-CoA	acyl-CoA à chaîne longue
Mn-SOD	superoxyde dismutase associée au manganèse
NADH,H ⁺ /NAD ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide réduit/oxydé
NADPH,H ⁺ /NADP ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit/oxydé
O ₂	dioxygène
O ₂ ^{•-}	anion superoxyde
OH ⁻	ion hydroxyde
OH [•]	radical hydroxyle
PKC	Protéine Kinase C
Q	quinone
TBARS	acide thiobarbiturique
Pi	phosphate inorganique
PTP	pore de transition de perméabilité
RCR	rapport de contrôle respiratoire
ROS	espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species)
SOD	superoxyde dismutase
TMPD	N,N,N',N' tétraméthyl-1,4-phenylènediamine
Ub	ubiquinone
UbH [•]	ubisemiquinone
UbH ₂	ubiquinol
UCP	protéine découplante (UnCoupling Protein)
w3	acide gras polyinsaturé omega 3
w6	acide gras polyinsaturé omega 6

AVANT-PROPOS

Une espèce réactive de l'oxygène (Reactive Oxygen Species : ROS) est un radical oxygéné ($O_2^{\bullet}$, $OH^{\bullet}$) ou une molécule pouvant produire des radicaux libres (H_2O_2). Ces espèces chimiques très instables et très réactives sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques. En condition dite "physiologique", la production de ROS reste faible et ne concerne qu'un faible pourcentage de l'oxygène capté par la respiration. Elle est alors indispensable à l'organisme en participant à divers processus vitaux tels que : la transduction de signaux cellulaires, la régulation des gènes et le fonctionnement de certaines enzymes, la défense immunitaire contre les agents pathogènes et la destruction par apoptose de certaines cellules tumorales.

Cependant, cette production de ROS peut être amplifiée de façon excessive par différents mécanismes physio-pathologiques (inflammation, activité sportive...) ou facteurs environnementaux (tabac, alcool, médicament, rayons gamma ou ultra-violets...) créant un déséquilibre de la balance prooxydant/antioxydant : c'est le stress oxydant. La cellule ne contrôle alors plus cet excès de ROS qui va engendrer de nombreux dégâts cellulaires ; une situation que l'on retrouve dans le processus de vieillissement (théorie radicalaire du vieillissement) et dans la plupart des pathologies humaines (Alzheimer, diabète, cancer, cataracte, parkinson, psoriasis, sida).

Ainsi, ayant besoin d'une certaine quantité de ROS, l'organisme ne cherche pas à éliminer mais à contrôler leur niveau pour éviter ce stress oxydant.

Les ROS sont principalement générés au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Parmi les différents paramètres modulant leur production, la nature des équivalents réduits ($NADH, H^+$ et $FADH_2$) et l'apport en oxygène sont essentiels. Ces équivalents réduits sont fournis par les divers nutriments que nous ingérons, la composition des régimes alimentaires peut donc avoir une répercussion sur la production de ROS. Les concentrations en oxygène inspirées sont, elles, modifiées par des conditions environnementales comme l'altitude (hypoxie) ou lors de traitement pour certaines pathologies respiratoires (hyperoxie).

Au vu de ces données, nous avons décidé de nous intéresser aux effets de différents régimes alimentaires (restriction calorique, régimes riches en lipides ou en fructose) ainsi qu'à l'hyperoxie sur la production mitochondriale de ROS.

De plus, le stress oxydant pouvant être minimisé par des apports en antioxydants, nous avons également étudié les conséquences d'une supplémentation par la GliSODin[®] qui est principalement constitué de superoxyde dismutase (la SOD ; une enzyme antioxydante).

INTRODUCTION

I. LE STRESS OXYDANT

I.1. DIFFERENTES FORMES DE RADICAUX LIBRES DE L'OXYGENE (ROS)

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairier son électron. Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un (agissant alors comme un réducteur). Cette première réaction conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux ; ceci explique que la production d'un premier radical libre puisse causer d'importantes lésions dans une cellule.

L' O_2 est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant sur leur orbitale externe deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en $O_2^{\cdot-}$ puis en H_2O_2 . Il est ainsi à l'origine de la formation d'espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species : ROS)

L'appellation ROS inclut les radicaux libres de l'oxygène : anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

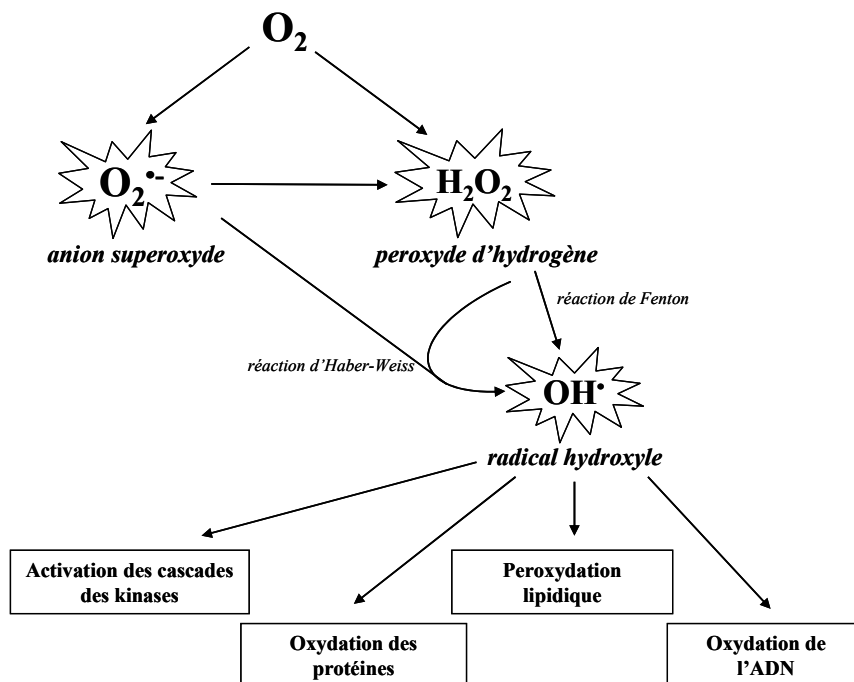


Figure 1 : Schéma des différentes formes de ROS

L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est un radical chargé négativement provenant de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire qui capte un électron. La dismutation de cet $O_2^{\bullet-}$ entraîne la formation d'oxygène fondamental et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L' H_2O_2 n'est pas un radical libre au sens propre mais il est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant. De plus, sa capacité à traverser les membranes biologiques fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de production.

Selon la réaction de Fenton, l' H_2O_2 se décompose, en présence d'ions ferreux (Fe^{2+}), en un ion OH^- et un radical hydroxyle ($OH^\bullet$) [$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^\bullet + OH^- + Fe^{3+}$]. Cette réaction s'interrompt rapidement par épuisement du fer ferreux, excepté en présence d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) qui régénère Fe^{3+} en Fe^{2+} selon la réaction d'Haber-Weiss [$O_2^{\bullet-} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$]. Ainsi, la présence simultanée de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et de fer permet la production de radical hydroxyle ($OH^\bullet$).

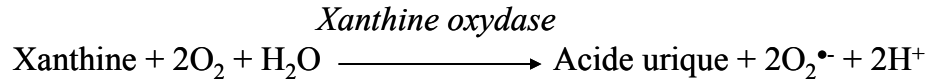
L' $OH^\bullet$, avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, est la plus instable et la plus réactive de toutes les espèces dérivées de l'oxygène. La diffusion limitée de ce radical lui permet de réagir avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant à proximité (protéines, lipides, ADN...) entraînant ainsi de multiples dommages cellulaires. L' $OH^\bullet$ apparaît comme l'espèce radicalaire ayant un rôle majeur dans la cytotoxicité des ROS (*Gutteridge & Halliwell, 1993*).

I.2. PRINCIPALE SOURCE DE RADICAUX LIBRES : LA MITOCHONDRIE

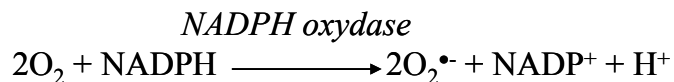
Dans l'organisme, il existe de nombreuses sources de ROS parmi lesquelles l'auto-oxydation des petites molécules, la xanthine oxydase et la NADPH oxydase, le réticulum endoplasmique, les peroxysomes.

L'auto-oxydation de molécules telles que la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones est une importante source de ROS (*Freeman & Crapo, 1981*). Le produit direct de ces auto-oxydations est souvent l' $O_2^{\bullet-}$. Ainsi, l'auto-oxydation de la dopamine est en partie impliquée dans le processus apoptotique lors de pathologies neurodégénératives, notamment lors de la maladie de Parkinson (*Thannickal & Fanburg, 2000*).

La xanthine oxydase catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique en condition de forte demande d'ATP et de déficit en oxygène. Mais elle peut également catalyser l'oxydation de la xanthine en acide urique, notamment lors d'ischémie-reperfusion ou d'hypoxie. Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi l' $O_2^{\bullet-}$ (McKelvey et al, 1988 ; Parks et al, 1988).



La NADPH oxydase joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes (Babior, 1999). En effet, lors de la phagocytose, cette enzyme présente dans la membrane plasmique des phagocytes, catalyse la formation d' $O_2^{\bullet-}$. Il existe aussi une NADPH oxydase dans des cellules non phagocytaires dont le rôle serait de réguler la croissance cellulaire (Krause, 2004).



Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent une série de réactions pour détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques (Freeman et al, 1983 ; Turrens et al, 1982). La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant ainsi des ROS (Morel et al, 1999). Il semble que cette production radicalaire régule certaines fonctions du réticulum.

Les peroxysomes sont une importante source de production d' H_2O_2 cellulaire (Boveris et al, 1972). Toutefois, l' H_2O_2 est utilisé comme substrat de la catalase peroxysomale (enzyme antioxydante) afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification présent dans le foie et le rein. Seule une faible quantité d' H_2O_2 produit au niveau du peroxysome pourrait échapper à la catalase.

Cependant, la principale source de ROS est la mitochondrie par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. Elle produirait en effet 90% des ROS cellulaires (Balaban et al, 2005).

I.2.1. Chaîne respiratoire mitochondriale

Les mitochondries sont les organites responsables de la plus grande partie de la production de l'énergie (sous forme d'ATP) nécessaire au fonctionnement cellulaire. Elles possèdent deux membranes délimitant un espace intermembranaire et un compartiment matriciel. La membrane externe, formée de 50% de protéines et 50% de lipides polaires, est perméable aux ions et aux petites molécules grâce entre autres à l'existence de porines. La membrane interne, quant à elle, est imperméable car elle est constituée pour 80% de protéines et 20% de lipides.

La membrane interne est le siège de la respiration qui correspond à un transfert d'électrons à travers la chaîne respiratoire jusqu'à un accepteur final : l'oxygène. Ces électrons proviennent des équivalents réduits NADH, H^+ et FADH_2 issus du catabolisme des nutriments (lipides, glucides). A ce flux d'électrons est associé un transfert actif de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire générant une force, la force protomotrice.

La phosphorylation oxydative est le processus de couplage entre le transfert d'électrons (oxydation) et la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique P_i (phosphorylation). Ce couplage n'est pas direct mais fait intervenir un intermédiaire énergétique, la force protomotrice qui est utilisée par l'ATP synthase (*Mitchell, 1961*).

La chaîne respiratoire est constituée de 4 complexes dont 3 s'avèrent être des pompes à protons (figure 2) :

Complexe I : NADH ubiquinone oxydoréductase

Le complexe I est le plus gros composant protéique de la membrane interne de la mitochondrie : il possède 46 sous-unités dont 7 sont codées par l'ADN mitochondrial et 39 par l'ADN nucléaire (*DiMaura & Schon, 2003*). Sa masse moléculaire est d'environ 750 kDa (*Schagger & Von Jagow, 1991*).

L'oxydation du coenzyme NADH, H^+ qui a lieu sur la face matricielle de la membrane par la NADH-déshydrogénase produit 2 électrons qui sont transférés jusqu'à l'ubiquinone (CoQ). Le complexe I est la première pompe à proton de la chaîne respiratoire.

Complexe II : Succinate-deshydrogénase

Le complexe II catalyse la ré-oxydation du succinate en fumarate qui, par l'intermédiaire de l'oxydation du FADH_2 et de la réduction d'ubiquinone, permet le transfert de 2 électrons au

complexe III (complexe b-c1). Ce transfert d'électrons est le seul à ne pas être couplé à un efflux de protons.

Complexe III : Complexe b-c1 (ubiquinone-cytochrome c réductase)

Le pool des quinones est un transporteur libre d'électrons des complexes I et II vers le complexe III. Ce dernier permet un transfert d'électrons à un deuxième transporteur mobile situé dans l'espace intermembranaire, le cytochrome c qui relie le complexe III au complexe IV. Ce transfert d'électrons, également associé à un efflux de protons, fait du complexe III la deuxième pompe à protons de la chaîne respiratoire.

Complexe IV : cytochrome c oxydase

Le complexe IV catalyse la dernière réaction d'oxydoréduction entre le cytochrome c et l'O₂ qui est réduit en H₂O par 4 électrons. Ce transfert d'électrons est irréversible, contrairement à celui qui a lieu dans les complexes I, II et III mais est aussi associé à un efflux de protons faisant de ce complexe le dernier site de couplage de la mitochondrie.

L'oxydation phosphorylante est le couplage entre la respiration mitochondriale et la production d'ATP. Ainsi, l'ATP synthase est parfois considérée comme le 5^{ème} complexe de la chaîne respiratoire.

ATP synthase

L'ATP synthase associe la diffusion facilitée des protons à la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de Pi. Le site catalytique est appelé F₁ et la sous-unité F_o est constituée d'un canal de protons. Ce complexe enzymatique permet la conversion de la différence de potentiel électrochimique en énergie chimique (ATP) au travers d'un processus réversible.

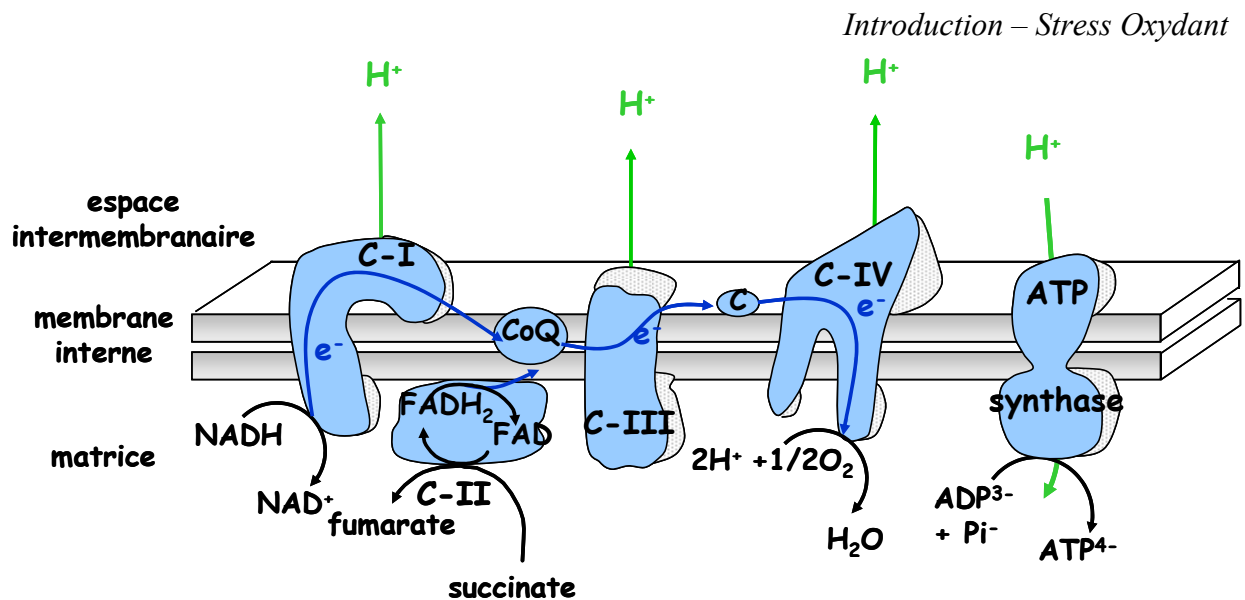


Figure 2 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale

I.2.2. Rendement de l'oxydation phosphorylante

Les équivalents réduits, $NADH, H^+$ et $FADH_2$ sont respectivement oxydés au niveau des complexes I et II de la chaîne respiratoire. Court-circuitant le complexe I, le nombre de protons expulsés par molécule d'oxygène durant l'oxydation du $FADH_2$ est plus faible que celui de l'oxydation du $NADH, H^+$. Ainsi, le rendement de l'oxydation phosphorylante, qui peut être mesuré par le rapport entre les flux d'ATP et d'oxygène (J_{ATP}/J_O) est plus faible avec $FADH_2$ qu'avec $NADH, H^+$. De ce fait, la différence essentielle entre le catabolisme du glucose et celui des acides gras tient à la proportion relative des équivalents réduits fournis à la chaîne respiratoire : le rapport $NADH, H^+$ sur $FADH_2$ est respectivement de 4 lors de l'oxydation du glucose et de 2 pour celle des acides gras. Cette différence est donc à l'origine de la perte de rendement de l'oxydation phosphorylante pour les acides gras.

D'après leur étude en 1955, Chance & Williams concluent que le premier facteur du contrôle de l'oxydation phosphorylante est la concentration d'ADP extra-mitochondriale. En effet, ils observent une relation hyperbolique entre le niveau de respiration mitochondriale et cette concentration en ADP. Ceci implique que l'adénine nucléotide translocase (ANT), qui permet la sortie de l'ATP et l'entrée de l'ADP dans la mitochondrie, contribue également à la régulation de la respiration. Toutefois, l'ADP extra-mitochondriale n'est pas le seul paramètre

contrôlant l'oxydation phosphorylante. En effet, d'autres facteurs jouent des rôles déterminants : 1°) la concentration extra-mitochondriale en phosphate inorganique (P_i), 2°) l'approvisionnement en H^+ , fourni par les différents substrats et 3°) l'activité de la cytochrome c oxydase (complexe IV) (Tager et al, 1983).

Dans les conditions de métabolisme basal, 90% de l' O_2 est consommé au niveau de la mitochondrie. De cette consommation mitochondriale, 80% sont utilisés pour la synthèse d'ATP et 20% lors de la fuite de protons (figure 3). La fuite de protons est caractérisée par le retour passif de protons dans la matrice (*proton leak*) et ceci sans passer par l'ATP synthase donc sans générer d'ATP (figure 4). Ces fuites membranaires diminuent la force protomotrice et induisent une baisse de l'efficacité de l'oxydation phosphorylante (Murphy, 1989).

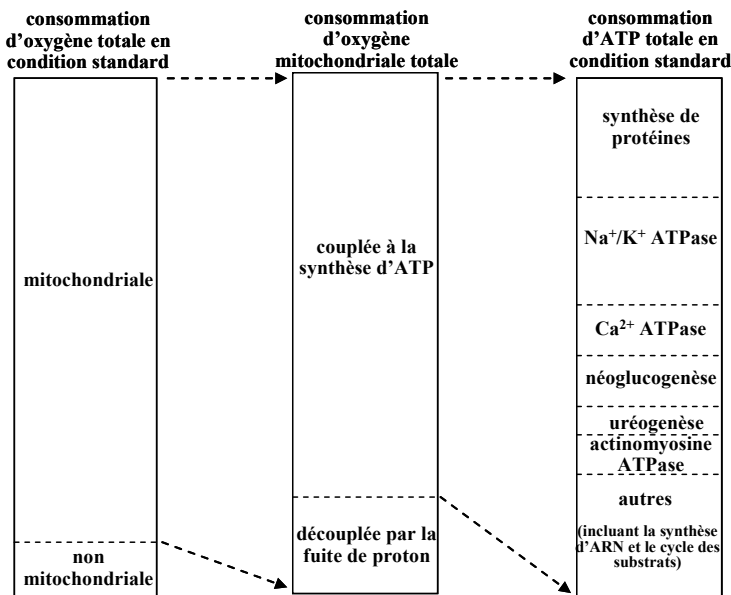


Figure 3 : Utilisation de l'énergie (O_2 et ATP) par l'organisme entier en condition de métabolisme basal. D'après Rolfe & Brown, 1997.

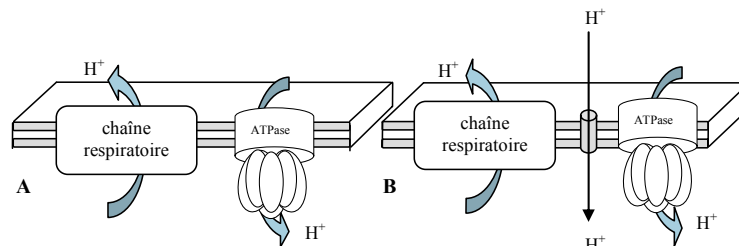


Figure 4 : Phénomène de *proton leak*

(A) La membrane est totalement imperméable aux protons, tout proton sortant est utilisé pour effectuer un travail (cas idéal) - (B) La membrane n'est pas totalement imperméable, certains protons regagnent la matrice sans générer de synthèse d'ATP.

En présence d'ADP (état 3), l'ATP produit par la mitochondrie est utilisé au cours de différents mécanismes cellulaires tels que la synthèse de protéine, le fonctionnement des pompes Na^+/K^+ -ATPase et Ca^{2+} -ATPase, lors de la néoglucogenèse ou pour la contraction musculaire avec l'actinomyosine-ATPase, etc... (Rolfe & Brown, 1997).

En absence d'ADP (état 4), les mitochondries continuent de consommer de l'oxygène afin de maintenir un potentiel de membrane maximum de 220 mV. Dans ces conditions de métabolisme basal, la fuite de protons compte pour 25% de la consommation d'oxygène dans les hépatocytes isolés et 50% dans le muscle perfusé. Lorsque la demande en ATP augmente (état 3), la fuite de protons diminue et ne représente plus que 20% de la consommation d'oxygène dans les hépatocytes et 35% dans le muscle (Rolfe & Brand, 1996 ; Rolfe et al, 1999).

Il existe également une perte d'efficacité intrinsèque aux pompes à protons due à un découplage partiel et variable des réactions chimiques (transfert d'électrons ou synthèse d'ATP) et du transport de protons, appelée *slipping*. Soit le transfert d'électrons n'est plus couplé à l'éjection de protons, ce qui entraîne une diminution de la stoechiométrie H^+/O au niveau de la chaîne respiratoire ; on parle alors de *redox slipping* (figure 5). Soit l'entrée de protons dans la matrice n'est plus couplée à la synthèse d'ATP, conduisant ainsi en une augmentation de la stoechiométrie H^+/ATP ; on parle alors de *proton slipping* (figure 6) (Murphy, 1989).

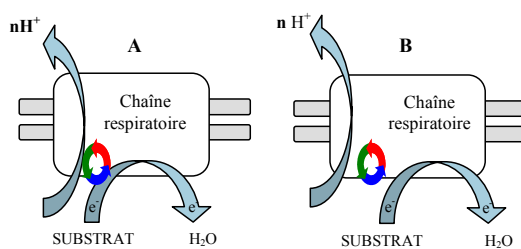


Figure 5 : Phénomène de *redox slipping*

(A) Les pompes à protons fonctionnent normalement, le transfert d'électrons à travers la chaîne respiratoire est couplé à l'expulsion de protons – (B) Les pompes patinent, il y a un découplage partiel entre les deux mécanismes.

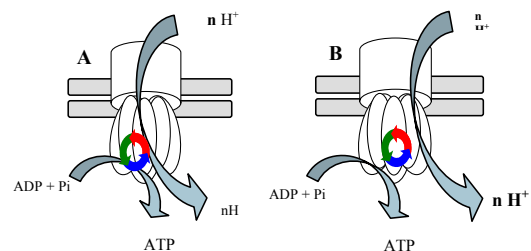


Figure 6 : Phénomène de *proton slipping*

(A) La synthèse d'ATP est couplée à l'entrée de protons dans l'espace matriciel via l'ATP synthase – (B) L'ATP synthase perd de son efficacité, l'entrée des protons dans la matrice n'est plus totalement couplée à la synthèse d'ATP

I.2.3. La production de ROS

La chaîne respiratoire est une source permanente de ROS. Selon certains auteurs, environ 1 à 3% de l'oxygène utilisés par la mitochondrie sont incomplètement réduits et produisent des ROS (Boveris *et al*, 1972 ; Boveris & Chance, 1973). Mais ces estimations sont réalisées à partir de mesure *in vitro* sur des mitochondries isolées en présence d'une pression partielle en oxygène non physiologique et de concentration saturante en substrats. Il est vraisemblable que la production mitochondriale de ROS *in vivo* soit beaucoup plus faible (0,4 à 0,8%) (Hansford *et al*, 1997).

Il existe deux sites de production de ROS : les complexes I et III (figure 7).

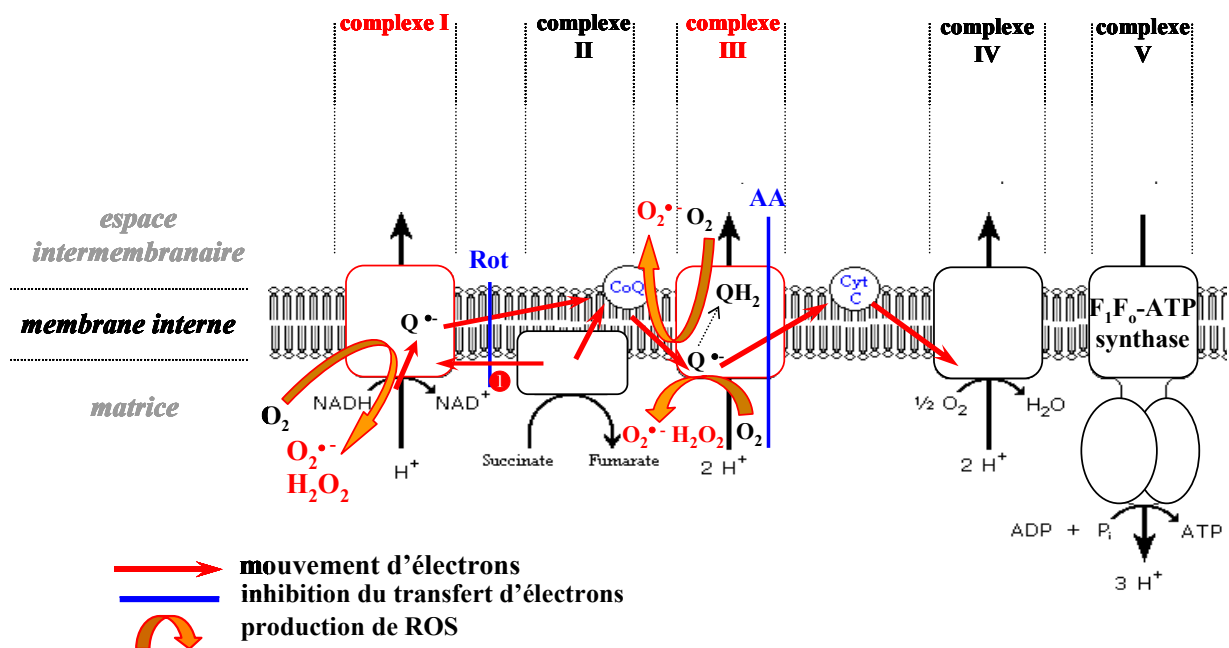


Figure 7 : Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire.

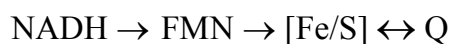
Deux sites de production d'O₂•⁻ sont reconnus : le complexe I et le complexe III. L'utilisation de la roténone (Rot) et de l'antimycine A (AA) a permis de localiser la production de ROS au niveau de ces complexes et de mettre en évidence le flux inverse d'électrons remontant du complexe II au complexe I.

Le complexe III a longtemps été considéré comme le plus important site de production d'O₂•⁻ et le complexe I comme un acteur secondaire (Cadenas *et al*, 1977 ; Turrens & Boveris, 1980 ; Turrens *et al*, 1985). Cependant, ces premières études utilisaient comme

substrat respiratoire du succinate (fournisseur de FADH_2) combiné à de la roténone (inhibiteur du complexe I). Or, en ajoutant successivement le succinate puis la roténone, de récentes mesures ont permis de mettre en évidence l'existence d'un flux inverse d'électrons. Ce flux d'électrons issus de l'oxydation du FADH_2 remonte du complexe II vers le complexe I atteignant ainsi le site de production de ROS du complexe I. Il a alors été clairement défini que la source majeure de ROS était le complexe I *via* ce flux inverse d'électrons (Barja, 1999 ; Hansford et al, 1997 ; Herreo & Barja, 1997). Ce flux d'électrons entraîne également la réduction du NAD^+ en NADH (Liu et al, 2002).

Ceci implique que la production de ROS est directement dépendante des équivalents réduits fournis aux mitochondries. La quantité d' H_2O_2 produite en présence de substrat fournissant du FADH_2 au complexe II (succinate, flux inverse d' e^-) est en effet plus importante qu'avec des substrats fournissant du NADH, H^+ au complexe I (glutamate/malate ou pyruvate/malate, flux normal d' e^-) (Gredilla et al, 2001a ; Liu et al, 2002 ; Sanz et al, 2004 ; Votyakova & Reynolds, 2001). Concernant la production de ROS liée au flux normal d'électrons, elle est plus élevée avec du glutamate/malate qu'avec du pyruvate/malate bien que ces deux substrats fournissent du NADH, H^+ (Sanz et al, 2004). Cette différence pourrait s'expliquer par les propriétés antioxydantes du pyruvate (Costantopoulos & Barranger, 1984).

A ce jour, le site exact de la production de ROS du complexe I reste encore controversé. Trois hypothèses sont émises : cette production aurait lieu au niveau 1°) des quinones (Q) (Cadenas et al, 1977), 2°) du groupe des flavines mononucléotides (FMN) (Liu et al, 2002) ou 3°) du groupe fer-soufre [Fe/S] (Genova et al, 2001 ; Kushnareva et al, 2002). Comme ces trois structures sont très proches les unes des autres et interagissent les unes avec les autres (Burbaev et al, 1989 ; Herrero & Barja, 2000), il est difficile de dire laquelle intervient spécifiquement dans la production de ROS.



La production de ROS au niveau du complexe III, quant à elle, résulte de la réduction partielle de l'ubiquinone. L'électron libre provenant du transfert à travers la chaîne respiratoire s'apparie avec l'ubiquinone (Ub) formant le radical semi-ubiquinone ($\text{UbH}^\bullet$) qui est instable. Un deuxième électron est donc nécessaire pour le stabiliser et permettre le transfert de proton grâce à l'intermédiaire ubiquinol (UbH_2) (figure 8A). Toutefois, il existe une probabilité pour que le radical semi-ubiquinone rencontre une molécule d'oxygène avant

d'être stabilisé par le deuxième électron. La molécule d'oxygène va alors capter l'électron libre générant ainsi un anion superoxyde (*Turrens et al, 1985*) (figure 8B).

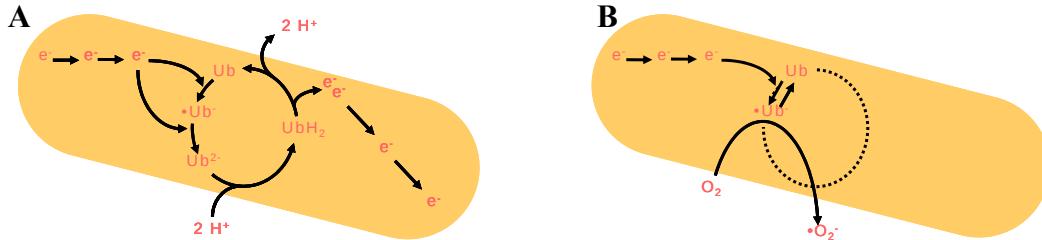


Figure 8 : boucle des quinones et production d'anion superoxyde.

(A) Deux électrons sont nécessaires pour réduire l'ubiquinone (Ub) en ubiquinol (UbH₂) et permettre le transfert de proton – (B) L'électron libre du semi-ubiquinone (UbH[•]) peut être capté par une molécule d'oxygène générant ainsi un anion superoxyde.

La production de ROS au niveau du complexe I a lieu uniquement dans la matrice alors que la production au niveau du complexe III a lieu dans l'espace matricielle ainsi que dans l'espace intermembranaire (figure 8) (*Chen et al, 2003a ; Han et al, 2003 ; St Pierre et al, 2002, Turrens, 2003*). L'O₂^{•-} généré dans la matrice est éliminé dans ce compartiment par la superoxyde dimutase mitochondriale (Mn-SOD), l'H₂O₂ alors produit peut diffuser rapidement à travers la membrane jusqu'au cytoplasme. L'O₂^{•-} produit dans l'espace intermembranaire est soit : 1°) transformé par l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase cytoplasmique (Cu/Zn-SOD, 2°) détoxifié par le cytochrome c, ou 3°) transféré dans la cytoplasme *via* un canal voltage dépendant (VDAC : *Voltage Dependent Anion Channels*), l'O₂^{•-} est alors pris en charge par la Cu/Zn-SOD (*Han et al, 2003*).

La vitesse de production de ROS est fonction du flux d'électrons dans la chaîne respiratoire et du degré de réduction des transporteurs d'électrons. Cependant, cette production radicalaire semble également liée au potentiel redox et au potentiel de membrane ($\Delta\psi$). D'une part, l'augmentation du potentiel redox entraîne une augmentation de la production de ROS (*Ksenzenko et al, 1984 ; Loschen & Flohé, 1973*). D'autre part, dans leur étude, *Korshunov et al (1997)* montrent une relation directe entre la respiration mitochondriale, le $\Delta\psi$ et la production de ROS (figure 9). Ainsi, une diminution du potentiel

de membrane s'accompagne d'une augmentation de la respiration et d'une diminution de la production de ROS.

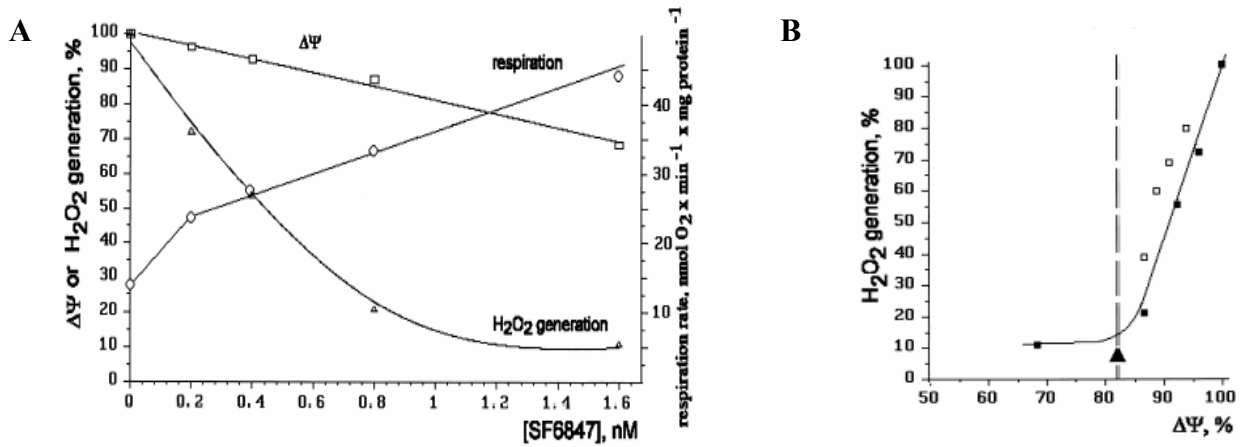


Figure 9 : Corrélation entre le potentiel de membrane, la consommation d' O_2 et la production de ROS dans les mitochondries de coeur. D'après Korshunov *et al*, 1997. (A) SF6847 est un découplant. L'augmentation de la concentration de SF6847 entraîne une diminution du potentiel de membrane qui a pour conséquence une augmentation de la respiration et une diminution de la production de ROS – (B) Pour les valeurs inférieures à 82% du $\Delta\psi$ une production de ROS résiduelle ($\approx 10\%$) persiste bien que le potentiel de membrane soit diminué. La relation linéaire entre la production de ROS et le potentiel de membrane n'est donc vraie qu'entre 82% et 100% de la valeur maximale du $\Delta\psi$ (état 4).

Puisque la consommation basale d'oxygène (état 4) est associée à un potentiel de membrane élevé et donc à un état plus réduit des transporteurs d'électrons, la production de ROS dans ces conditions est la plus importante. Par contre, elle est drastiquement diminuée en condition d'oxydation phosphorylante (état 3, après ajout d'ADP). En effet, la présence d'ADP, stimulant la respiration, augmente l'oxydation des transporteurs d'électrons et ainsi diminue fortement le flux d'électrons s'échappant de la chaîne respiratoire pour réduire l' O_2 en $\text{O}_2^{\bullet -}$ (Boveris *et al*, 1972 ; Herrero & Barja, 1997).

Néanmoins, la corrélation entre le potentiel de membrane et la production de ROS est à nuancer. La production de ROS liée à l'oxydation du NADH, H^+ au niveau du complexe I ainsi que celle générée au niveau du complexe III sont peu sensibles aux variations du $\Delta\psi$ (Starkov & Fiskum, 2003 ; Votyakova & Reynolds, 2001). Starkov & Fiskum (2003) confirment ces données en observant une quantité significative d' H_2O_2 produite en présence de substrats fournissant du NADH, H^+ même en absence de $\Delta\psi$ (30% de la valeur obtenue en $\Delta\psi$ maximal). Ainsi, seul le flux inverse d'électrons est réellement sensible au $\Delta\psi$ (Korshunov *et al*, 1998) ; une légère dépolarisation étant suffisante pour inhiber complètement la

production de ROS par cette voie (*Votyakova & Reynolds, 2001*). Il existe donc deux mécanismes dans la production de ROS : un mécanisme dépendant du potentiel de membrane de la mitochondrie et un mécanisme indépendant de ce potentiel.

Nous avons vu que l'imperméabilité de la membrane interne n'est pas absolue ce qui permet à une faible quantité de protons de retourner dans la matrice mitochondriale (*proton leak*). Certains auteurs (*Brand, 2000 ; Skulachev, 1998*) avancent une hypothèse selon laquelle cette fuite de protons régulerait la production de ROS (hypothèse d'un "découplage modéré"). La composition lipidique de la membrane est un élément capital de la perméabilité aux protons : un faible degré d'insaturation est associé à une faible fuite de protons, et inversement (*Brand et al, 2003 ; Porter et al, 1996*). Mais en plus de cette perméabilité intrinsèque, il existe une perméabilité inductible par des protéines découplantes enchâssées dans la membrane mitochondriale. Ces protéines (uncoupling protein, UCP) permettent, par leur fonction de transporteurs de protons, la dissipation de l'énergie liée au potentiel électrochimique. Si l'UCP1, protéine découplante du tissu adipeux brun, participe aux processus de thermogénèse, ses homologues (UCP2, UCP3) semblent, quant à eux, jouer un rôle dans le contrôle de la production de ROS (*Negre-Salvayre et al, 1997; Ricquier, 2005; Vidal-Puig et al, 2000*). En effet, *Negre-Salvayre et al (1997)* observent dans les tissus exprimant fortement UCP2 (rate, thymus) une faible production d'H₂O₂. De plus, l'inhibition d'UCP2 dans ces tissus entraîne une augmentation de la quantité d'H₂O₂ produite. Enfin, l'invalidation des gènes UCP2 et UCP3 dans des modèles de souris transgéniques (*Arsenijevic et al, 2000 ; Vidal-Puig et al, 2000*) confirment qu'un défaut d'expression de ces protéines découplantes s'accompagne d'une augmentation de la production de ROS.

I.3. SYSTEMES ANTI-OXYDANTS

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques (*Dröge, 2002 ; Mates et al, 1999 ; Packer et al, 1997 ; Powers & Lennon, 1999*).

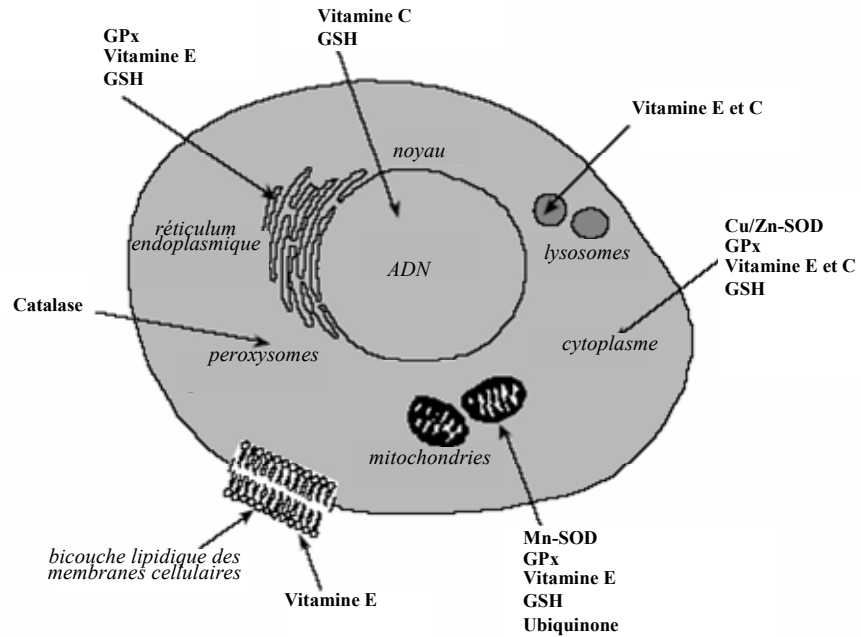


Figure 10 : Répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule.

(Mn-SOD) : superoxyde dismutase mitochondriale, (Cu/Zn-SOD) : superoxyde dismutase cytosolique, (GPx) : glutathion peroxydase, (GSH) : glutathion réduit.

I.3.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion reductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS.

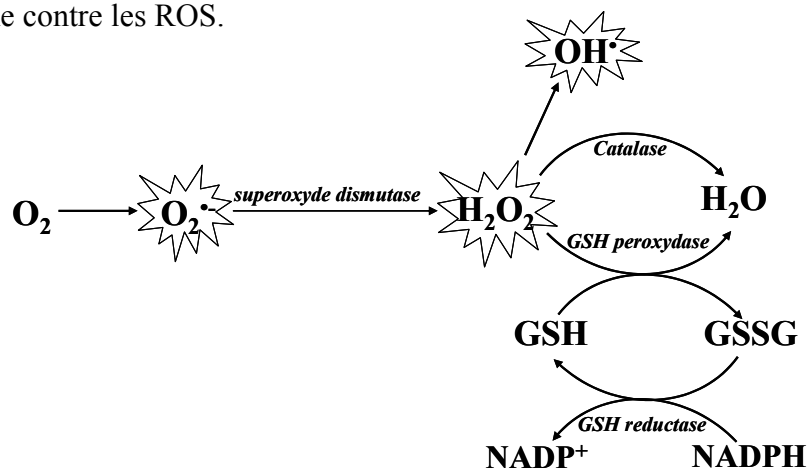


Figure 11 : Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques

1.3.1.a. Superoxyde dismutase (SOD)

Cette enzyme catalyse la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 .

La SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD). Il a été récemment montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace intermembranaire (*Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001 ; Sturtz et al, 2001*). La distribution de ces différentes isoformes varie selon le tissu. Dans le muscle, environ 65 à 85% de l'activité de la SOD se trouvent dans le cytosol tandis que les 15 à 35% restants sont localisés dans les mitochondries. Cependant, la Mn-SOD semble indispensable à la vie puisque sa mutation est non viable ; l'espérance de vie maximale pour des souris Mn-SOD^{-/-} n'est que de 22 jours pour certains types de mutations (*Huang et al, 2001*). Ceci n'est pas le cas pour la forme cytosolique bien que l'espérance de vie chez des souris transgéniques Cu/Zn-SOD^{-/-} soit plus faible que celle de souris Cu/Zn-SOD^{+/+} (130 semaines vs 180 semaines) (*Sentman et al, 2006*).

1.3.1.b. Glutathion peroxydase (GPx) et reductase (GR)

La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H_2O_2 en H_2O et O_2 . Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG) (*Mates et al, 1999; Powers & Lennon, 1999*). Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique (*Mates et al, 1999 ; Nomura et al, 2000*).

La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction.

Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries.

I.3.1.b. Catalase

La catalase est également responsable de l'élimination d' H_2O_2 par une transformation en H_2O et O_2 . Contrairement à la GPx, l'affinité de la catalase pour l' H_2O_2 est élevée seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues (*Mates et al, 1999 ; Powers & Lennon, 1999*). Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol.

I.3.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le cytochrome c et les vitamines E et C.

I.3.1.a. Oligoéléments

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action prooxydante (réaction de Fenton, d'Haber-Weiss).

I.3.2.b. Glutathion

Le glutathion réduit (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPx). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique (*Power & Lennon, 1999 ; Packer et al, 1997*). Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d' H_2O_2 est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (*Ji et al, 1992*).

I.3.2.c. Ubiquinones et cytochrome c

Il a été décrit précédemment que les ubiquinones, sous leur forme semi-radicalaire, jouaient un rôle fondamental dans la production de ROS. Inversement, il a pu être défini que la forme "ubiquinol" agissait comme antioxydant (*Power & Lennon, 1999*). L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxy. L'ubiquinone est également impliquée dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS (*Packer et al, 1997*).

Le cytochrome c présent dans l'espace intermembranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre d' $O_2^{\bullet-}$ produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe IV formant du cytochrome c oxydé et de l' H_2O (*Skulachev, 1998*).

I.3.2.d. Vitamine E et vitamine C

Les vitamines E (α -tocophérol) et C (acide ascorbique) semblent être des plus importants dans la lutte contre le stress oxydant.

La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique (*Evans, 2000 ; Packer et al, 1997*).

La vitamine C, hydrosoluble, se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; elle peut capter directement l' $O_2^{\bullet-}$ et l' $OH^{\bullet}$. Elle peut aussi réduire le radical α -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E (figure 11) (*Evans, 2000 ; Packer et al, 1997*).

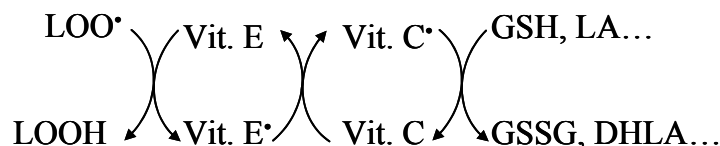


Figure 12 : Schéma des réactions d'élimination des radicaux lipidiques par les vitamines E et C.

($LOO^{\bullet}$) : radical peroxy lipidique, (LOOH) : hydroperoxyde lipidique, (Vit. E) : vitamine E, (Vit. C) : vitamine C, (GSH) : glutathion réduit, (GSSG) : glutathion oxydé, (LA) : acide lipoïque, (DHLA) : acide dehydrolipoïque.

I.4. DEGATS CELLULAIRES

Les dommages induits par les ROS sont : une peroxydation des lipides, une oxydation des protéines, des mutations de l'ADN. Ces altérations peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité, voire à la mort cellulaire notamment par l'intermédiaire de l'apoptose (mort cellulaire programmée). Les ROS initient également l'apoptose en activant l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP).

I.4.1. Peroxydation lipidique

Les premières cibles des ROS sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (*Hulbertl, 2005 ; Pamplona et al, 2000*). L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation de lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (*Hong et al, 2004*). Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (*Marnett, 1999*). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), le acides thiobarbiturique (TBARS) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE) sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique. Cependant, le 4-HNE peut activer directement le découplage mitochondrial par action directe sur les UCP et pourrait ainsi réduire la production mitochondriale de ROS (*Echtay et al, 2003*). Ce mécanisme pourrait être un moyen de réguler la production de ROS.

I.4.2. Oxydation des protéines

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ROS. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine (*Levine, 2002 ; Peng et al, 2000*). Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} , peuvent être classées en deux catégories : 1°) celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique, 2°) les modifications des peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique. Ces changements sont tels qu'ils conduisent à une modification structurale des protéines dont les conséquences sont majeures (perte de fonction catalytique,

augmentation de la sensibilité aux protéases...) (*Levine, 2002*). L'oxydation des protéines peut être un signal pour les "protéines de stress" (Heat Shock Protein, HSP) connus pour leur rôle cytoprotecteur (*Welch, 1992*). Ainsi, les membres de la famille de HSP70 ont un rôle de protéines chaperonnes. Elles prennent en charge les protéines dénaturées (participation à la restauration de la fonction de ces protéines) mais aussi les protéines en cours de maturation (participation à leur synthèse, à leur importation vers le réticulum endoplasmique et la mitochondrie). La synthèse des HSP pourrait ainsi compléter les capacités de défenses antioxydantes lorsque les protéines intracellulaires sont endommagées par les ROS (*Essig & Nosek, 1997*).

I.4.3. Dommage de l'ADN

Le stress oxydant étant principalement d'origine mitochondriale, ces organites sont les premières cibles des ROS. En effet, le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant qui est 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire (*Richter et al, 1988*). Les mécanismes explicatifs proposés sont : 1°) l'absence d'histones protectrices autour de l'ADN mitochondrial, 2°) sa localisation proche de la membrane interne, 3°) des mécanismes de réparations frustrés, et 4°) une structure circulaire sans introns augmentant statistiquement le risque de mutations pathogènes (*Ames et al, 1993 ; Cann & Wilson, 1983 ; Cortopassi et al 1992 ; Richter et al, 1988*). L'idée d'un "cercle vicieux" ou d'une théorie avec un *feed-back* positif est avancée pour expliquer les altérations mitochondriales dues au vieillissement : des dysfonctionnements de la chaîne respiratoire pourraient augmenter la production de ROS et induire ainsi une augmentation progressive des mutations du génome mitochondrial et des protéines synthétisées. Comme le génome mitochondrial code pour quelques sous-unités de protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative (sept sous-unités du complexe I, une du complexe III, trois du complexe IV et deux de l'ATP synthase), leur défaut d'expression pourrait exacerber la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire au profit de la production de ROS. Ainsi, plus la fuite d'électrons est importante, plus la formation de ROS provoquant de nombreuses mutations mitochondriales aggraverait ce phénomène (*Beckman & Ames, 1998 ; Wong & Cortopassi, 1997*).

Les fonctions de la mitochondrie sont donc particulièrement exposées aux dommages oxydatifs provoquant principalement une diminution de la synthèse d'ATP mais aussi

engageant la cellule dans un programme de mort cellulaire par apoptose avec l'induction du pore de transition de perméabilité (PTP).

I.4.4. Activation du pore de transition de perméabilité.

Bien que la nature moléculaire du pore de transition de perméabilité (PTP) reste encore à ce jour inconnue, il apparaît que le PTP est un complexe multiprotéique avec de nombreuses protéines candidates dont le VDAC : *Voltage Dependent Anion Channel*), l'ANT (*Adenine Nucleotide Translocator*), la cyclophiline D (*Green & Reed, 1998 ; Zamzami et al, 1998*) (figure 13), le complexe I (*Fontaine et al, 1999*). La ciclosporine A, inhibiteur de référence du PTP, retarde le processus d'apoptose (*Fontaine et al, 1998*) confirmant le rôle clé du PTP dans la mort cellulaire.

Succinctement, l'ouverture du PTP provoque un gonflement mitochondrial résultant de l'entrée dans la matrice de composés osmotiquement actifs. Suite à ce gonflement, la membrane externe peut se rompre et entraîner la sortie de molécules pro-apoptotiques (cytochrome c, AIF (*Apoptose Inducting Factor*)). Le cytochrome c alors relargué interagit avec Apaf-1 (*Apoptosis Activating Factor-1*) et la pro-caspase 9, ce qui a pour conséquence l'activation de la cascade des caspases déclenchant l'apoptose (figure 13) (*Green & Reed, 1998*). L'ouverture du PTP est très finement régulée. Le calcium matriciel apparaît comme étant son inducteur le plus puissant, nécessaire et suffisant (*Bernardi, 1999*).

Les ROS agissent directement sur l'ouverture du PTP, pore qui intervient dans le processus d'apoptose (figure 12) (*Chen et al, 2003b ; Skulachev, 1996*). Selon l'équipe de Vercesi, l'ouverture du PTP induit par les ROS serait consécutive à l'oxydation d'un groupement thiol constituant ce pore (*Vercesi et al, 1997; Kowaltowski et al, 2001*).

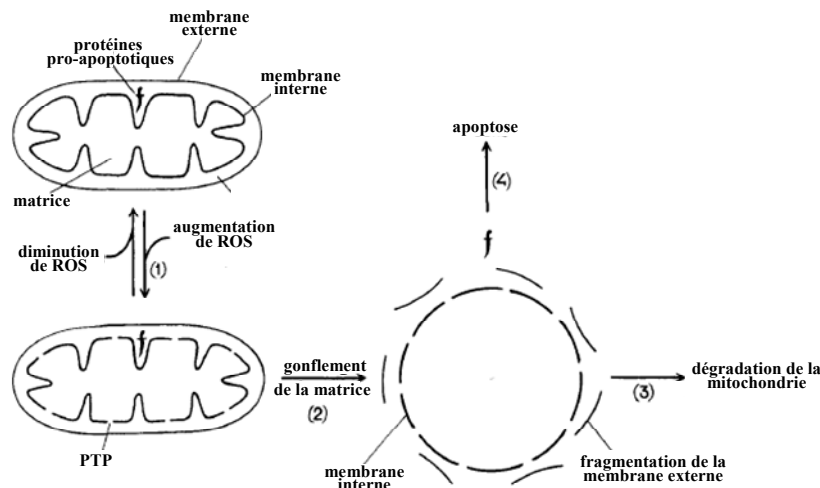
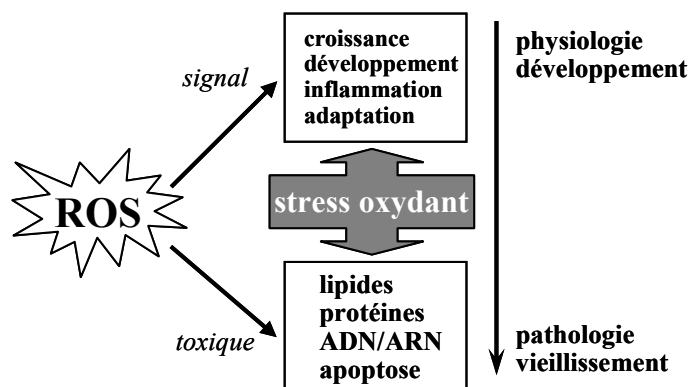


Figure 13 : Production de ROS, ouverture du PTP et apoptose. D'après Skulachev, 1996.

(1) L'augmentation de la production de ROS entraîne l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP). (2) Un déséquilibre osmotique entre la matrice et l'espace intermembranaire se crée, ayant pour conséquence le gonflement de la matrice et la fragmentation de la membrane externe (3) La mitochondrie est alors dégradée (sélection mitochondriale). (4) Les protéines pro-apoptotiques séquestrées dans l'espace intermembranaire sont libérées dans le cytosol initiant une cascade de réactions qui aboutit à l'apoptose (sélection cellulaire).

La production de ROS, lorsqu'elle n'est plus contrôlée par les défenses antioxydantes, entraîne de nombreuses perturbations : c'est le stress oxydant.



Parmi les différents paramètres pouvant moduler cette production de ROS, la nature et la proportion des équivalents réduits ainsi que la concentration en oxygène sont essentielles.

Il est possible de modifier les apports en équivalents réduits par les régimes alimentaires et les apports en oxygène par l'hyperoxie. Ce sont donc ces 2 facteurs que nous allons développer par la suite.

II. LES REGIMES ALIMENTAIRES

Dans cette partie, nous développerons plus particulièrement les mécanismes mis en jeu dans le foie et le muscle squelettique sous l'influence de différents régimes alimentaires (restriction calorique, régime riche en lipides, régime riche en saccharose/fructose). Ces deux organes occupent en effet une place centrale dans le maintien de la balance nutritionnelle. Le foie est l'organe principal intervenant dans la régulation de l'homéostasie glucidique : il peut alternativement libérer du glucose dans la circulation sanguine ou en prélever et le stocker. Le muscle squelettique, quant à lui, est un organe important dans la consommation des glucides et des lipides.

II.1. RESTRICTION CALORIQUE ET RAT LOU/C

II.1.1. Restriction calorique

La restriction calorique est connue pour améliorer l'espérance de vie et comme l'indique Ramsey *et al* (2000), plus la restriction calorique est importante plus l'espérance de vie est augmentée. Ainsi, chez le rat, une restriction calorique de 40% peut augmenter la longévité de 30 à 50% (Barja & Herrero, 2000 ; Gredilla *et al*, 2001b ; Sohal & Weindruch, 1996). Cet accroissement de la longévité est corrélée à une diminution du stress oxydant (Masoro, 2000 ; Merry, 2002 ; Sohal & Weindruch, 1996).

Cette diminution du stress oxydant se manifeste par 1°) une réduction de la production mitochondriale de ROS dans la plupart des organes (cerveau, cœur, foie, muscle squelettique, rein) (Bevilacqua *et al*, 2004 ; Bevilacqua *et al*, 2005 ; Gredilla *et al*, 2001a ; Gredilla *et al*, 2001b ; Gredilla & Barja, 2005 ; Lopez-Torres *et al*, 2002 ; Sohal *et al*, 1994), 2°) une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes (Lass *et al*, 1998 ; Sohal *et al*, 1994 ; Sreekumar *et al*, 2002b).

Dans les mitochondries de foie, une restriction calorique de 40% sur une courte période (6 semaines) diminue la production de ROS de 23% (Gredilla *et al*, 2001a), cette baisse pouvant atteindre 47% si la restriction calorique se poursuit sur une plus longue durée

(12 mois) (Lopez-Torres et al, 2002). Dans le muscle squelettique, cette production de ROS est réduite de moitié quelque soit la durée de la restriction calorique (2 semaines, 2-12-18 mois) (Bevilacqua et al, 2004 ; Bevilacqua et al, 2005). Ceci a pour conséquence une atténuation des dégâts cellulaires qu'il s'agisse de la peroxydation lipidique (Bevilacqua et al, 2005 ; Lass et al, 1998), de l'oxydation des protéines (Sohal et al, 1994 ; Lass et al, 1998) ou des dommages de l'ADN (Drew et al, 2003 ; Gredilla et al, 2001b ; Gredilla & Barja, 2005 ; Lopez-Torres et al, 2002). De plus, la capacité de rétention calcique, c'est-à-dire la quantité de calcium nécessaire pour induire l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP), est plus importante chez les rats restreints comparativement aux rats nourris *ad libitum* (Kristal & Yu, 1996). Ces données confirment les effets protecteurs de la restriction calorique.

Une des premières hypothèses pour expliquer le ralentissement des processus de vieillissement induit par la restriction calorique est émise par Pearl (1928). Sa théorie du "*rate of living*" postule que la longévité est inversement proportionnelle à la dépense énergétique. Par ailleurs, il est aussi proposé que le vieillissement soit le résultat de l'accumulation de dommages induits par la production de ROS lors du métabolisme aérobie (Harman, 1981). Mais ces deux théories impliqueraient le même mécanisme puisque la diminution de la dépense énergétique pourrait abaisser la production de ROS en réduisant le nombre de molécules d'oxygène interagissant avec la chaîne respiratoire mitochondriale.

Différentes études montrent que la restriction calorique entraîne bien une diminution de la dépense énergétique du corps entier (Ramsey et al, 2000). Trois processus majeurs contribuent à cette baisse de la dépense énergétique : la fuite de protons au niveau de la mitochondrie ($\approx 20\%$), l'activité de la Na^+/K^+ ATPase (10 à 30%) et le turnover protéique (10 à 25%). Toutefois, seuls deux de ces processus interviennent réellement lors de la restriction calorique : la diminution de la fuite de protons, qui est le processus dominant, et celle de l'activité de la Na^+/K^+ ATPase (Ramsey et al, 2000). La modification de la composition membranaire des mitochondries induite par la restriction calorique peut contribuer à cette diminution de la fuite de protons. En effet, chez les rats restreints, le contenu en acides gras insaturés est diminué alors que celui en acides gras saturés est augmenté (Cefalu et al, 2000 ; Merry, 2002 ; Pamplona et al, 2002). Or, Porter et al (1996) observent qu'un faible degré d'insaturation est associé à une faible fuite de protons.

Cette diminution de la fuite de protons s'accompagne d'une diminution de la consommation d'oxygène mitochondriale, notamment dans le foie (Ferreira et Gil, 1984 ; Ramanadham & Kaplay, 1979 ; Dumas et al, 2004) et dans le muscle squelettique (Ardawi et

al, 1989 ; *Lal et al*, 2001 ; *Madapallimattan et al*, 2002). Ceci a pour conséquence une diminution de la production de ROS : en diminuant le flux d'électrons, la probabilité qu'un électron libre rencontre une molécule d'oxygène baisse (*Ramsey et al*, 2000 ; *Bevilacqua et al*, 2004).

La composition intrinsèque de la mitochondrie peut contribuer à la diminution de la respiration mitochondriale. Ainsi, dans le foie, la diminution de la consommation d'O₂ semble être liée au complexe IV. En effet, la respiration en condition phosphorylante (état 3) est plus faible chez les rats restreints comparativement aux rats nourris *ad libitum* et ce, quels que soient les substrats utilisés (mesure en présence de glutamate/malate pour le complexe I, de succinate pour le complexe II, et d'ascorbate + TMPD pour le complexe IV) (*Dumas et al*, 2004 ; *Ferreira & Gil*, 1984). L'activité enzymatique du complexe IV ainsi que son contenu en cytochrome a+a₃ sont également plus faibles chez ces rats restreints (*Ferreira & Gil*, 1984 ; *Ramanadham & Kaplay*, 1978).

Dans le muscle squelettique, la diminution de la consommation d'oxygène semble, elle, être principalement liée au complexe I. Chez des souris soumises à une restriction calorique de 40% pendant 10 mois, *Desai et al* (1996) observent une diminution de l'activité du complexe I de 60% alors que les activités des complexes III et IV ne sont, elles, diminuées respectivement que de 30% et 40% et qu'aucune modification de l'activité du complexe II n'est observée. Des résultats similaires sont retrouvés dans d'autres études (*Briet & Jeejeebhoy*, 2001 ; *Madapallimattan et al*, 2002). Ces diminutions des activités des complexes I et III peuvent intervenir directement dans la diminution de la production d'H₂O₂ car ces deux complexes sont les deux sites de production de ROS de la chaîne respiratoire mitochondriale (*Barja*, 1999 ; *Boveris et al*, 1976 ; *Desai et al*, 1996 ; *Herrero & Barja*, 1997).

Cependant, si une diminution de la fuite de protons est observée dans les mitochondries de muscle squelettique dès 2 semaines de restriction calorique à 40% (*Bevilacqua et al*, 2004), aucune modification de cette fuite n'est observée dans le foie avant 12 mois (*Dumas et al*, 2004 ; *Ramsey et al*, 2004 ; *Hagopian et al*, 2005). Ces résultats indiquent que les mitochondries de muscle squelettique et de foie répondent différemment à la restriction calorique. Le muscle est un tissu post-mitotique qui montre des dommages oxydatifs considérables et une atrophie avec l'âge (*Sohal & Weindruch*, 1996). Le foie, quant à lui, est moins affecté par le vieillissement (*Jansen*, 2002) et tend à montrer des dégâts

oxydatifs seulement à un âge avancé (*Tian et al, 1998*). De plus, après initiation de la restriction calorique, la masse du foie diminue rapidement alors que celle du muscle squelettique change plus lentement (*Ramsey et al, 2000*). Considérant ces différences entre les tissus, il n'est pas surprenant qu'ils aient des réponses métaboliques différentes. Il est possible que le foie s'adapte à la restriction calorique en diminuant sa masse sans modifier le métabolisme énergétique des mitochondries alors que le muscle squelettique répondrait en diminuant la fuite de protons ou l'activité d'autres voies consommant de l'énergie (*Ramsey et al, 2004*).

D'autres divergences existent. En effet, si Hagopian *et al* (2005) obtiennent une diminution de la consommation d'O₂ dans les mitochondries de foie ceci n'est pas retrouvé par Lopez-Torres *et al* (2002) bien que, dans ces 2 études, la restriction calorique soit de 40% sur une période de 12 mois et qu'une réduction de la production de ROS soit observée. Ceci peut s'expliquer d'une part par la différence de souche de rats utilisée (Wistar vs FBNB_{F1}), d'autre part la différence d'âge des rats lors de l'initiation à la restriction calorique (6 mois vs 12 mois). De la même manière, après ces 12 mois de restriction calorique à 40%, une diminution de la consommation d'O₂ mitochondriale est obtenue dans le muscle squelettique (*Bevilacqua et al, 2005*) mais pas dans le cœur (*Gredilla et al, 2001b*). Ainsi, la durée de la restriction calorique, l'âge, le tissu ainsi que la souche de rat jouent un rôle prépondérant dans la détermination de la fuite de protons en réponse à la restriction calorique.

De plus, il est montré que tous les changements du métabolisme énergétique disparaissent avec une restriction calorique maintenue sur une longue période (*Greenberg & Boozer, 2000 ; McCarter & McGee, 1989 ; Ramsey et al, 2000*). Dans l'étude de McCarter & McGee (1989), une restriction calorique de 40% pendant 8 semaines entraîne bien une diminution du métabolisme énergétique. Après 12 semaines de cette même restriction, les métabolismes énergétiques des rats restreints et des rats nourris *ad libitum* sont similaires. Ainsi, certains auteurs avancent que la diminution de la production de ROS induite par la restriction calorique n'est pas due à une diminution de la fuite de protons mais à un état réduit du complexe I plus faible (*Gredilla et al, 2001a ; Gredilla et al, 2001b ; Lopez-Torres et al, 2002*). En effet, dans ces études, aucune altération de la consommation d'oxygène mitochondriale n'est observée (à l'état 4 et état 3 en présence de pyruvate/malate ou de succinate, dans le foie et le cœur). Par contre, la production de ROS est diminuée mais cette diminution est spécifique au complexe I. Ceci est mis en évidence par 1°) la plus faible production de ROS chez les rats restreints comparativement aux rats nourris *ad libitum* lorsque les mitochondries sont incubées avec du pyruvate/malate (flux normal d'électrons) ou

du succinate seul (flux inverse d'électrons), et 2°) la disparition de ces différences de production de ROS entre les 2 groupes après ajout de roténone qui entraîne une réduction du complexe I à 100% (*Gredilla et al, 2001a ; Gredilla et al, 2001b ; Lopez-Torres et al, 2002*). Ceci leur permet de conclure en un plus faible état réduit du complexe I chez les rats soumis à une restriction calorique.

La diminution du rapport acides gras insaturés/saturés joue également un rôle fondamental dans la diminution des dommages liés au stress oxydant. Ces modifications membranaires rendent les membranes moins sensibles aux peroxydations lipidiques en diminuant le contenu en acides gras polyinsaturés qui sont hautement oxydables (*Hulbert, 2005 ; Pampola et al, 2000*). De plus, l'augmentation du catabolisme des protéines dans le foie et le muscle squelettique observée chez des rats restreints (*Dhahbi et al, 1999 ; Dhahbi et al, 2001 ; Hagopian et al, 2003a ; Hagopian et al, 2003b*) suggère une augmentation du turnover des protéines et ainsi un meilleur renouvellement protéique. Ceci contribue à la diminution des dommages oxydatifs et donc à l'augmentation de l'espérance de vie (*Dhahbi et al, 1999*).

Une modification de la composition protéique des membranes mitochondriales est également observée dans le muscle squelettique de rats soumis à une restriction calorique avec une augmentation des UCP2 et UCP3 (*Barazzoni et al, 2005 ; Bevilacqua et al, 2004, Bevilacqua et al, 2005 ; Cadenas et al, 1999*). Or, dans ces différentes études, la fuite des protons des rats restreints est soit plus faible, soit comparable à celle des rats nourris *ad libitum* (*Bevilacqua et al, 2004, Bevilacqua et al, 2005 ; Cadenas et al, 1999*). Iossa *et al* (2001) montrent en effet que les UCP3 ne contrôlent pas la fuite intrinsèque de protons des mitochondries de muscle squelettique. Toutefois, ces UCP jouent un rôle important dans la diminution de la production de ROS (*Arsenijevic et al, 2000 ; Negre-Salvayre et al, 1997; Ricquier, 2005 ; Vidal-Puig et al, 2000*) mais aussi dans une amélioration de l'oxydation des acides gras (*Boss et al, 2000 ; Himms-Hagen & Harper, 2001 ; Schrauwen & Hesselink, 2002*). En effet, ces UCP semblent intervenir dans le changement du métabolisme du muscle squelettique en augmentant l'utilisation des lipides lors d'une restriction calorique (*Barazzoni et al, 2005 ; Hagström-Toft et al, 2001 ; Samec et al, 1998*).

II.1.2. Le rat Lou/C

Il existe une souche de rat qui présente une prise alimentaire spontanément réduite : le rat Lou/C.

Ce rat Lou/C, issu de la souche Wistar (Bazin et Beckers, l'Université de Louvain en Belgique), manifeste deux particularités qui semblent antinomiques : une restriction alimentaire spontanée (entre 40 et 50 kcal/jour contre 80 à 90 kcal/jour pour les rats Wistar) (*Couturier et al, 2002 ; Veyrat-Durebex et al, 1998*) et une préférence alimentaire pour les lipides qui peuvent constituer jusqu'à 80% de leurs apports caloriques totaux (*Boghossian et al, 2000 ; Veyrat-Durebex & Alliot, 1997 ; Veyrat-Durebex et al, 1998*).

La faible prise alimentaire observée chez les rats Lou/C comparativement aux rats Wistar a pour conséquence un ralentissement de leur courbe de croissance (figure 14) (*Couturier et al, 2002*). Cette diminution de la courbe de croissance est comparable à celle de rats soumis à une restriction calorique de 40% débutée très tôt après leur sevrage (*Ramsey, 2000*). Ces rats se caractérisent ainsi par une faible masse corporelle (autour de 300 g à l'âge adulte) et par un pourcentage de masse grasse qui reste constant tout au long de leur vie (autour de 12% de leur poids corporel alors que celui du rat Wistar peut dépasser 30%) (photo) (*Boghossian et al, 2000*). De plus, ils ne développent pas d'obésité avec l'âge contrairement aux souches plus communes telles que les rats Wistar dont ils sont issus (*Newby et al, 1990*), Sprague Dawley ou Fisher.

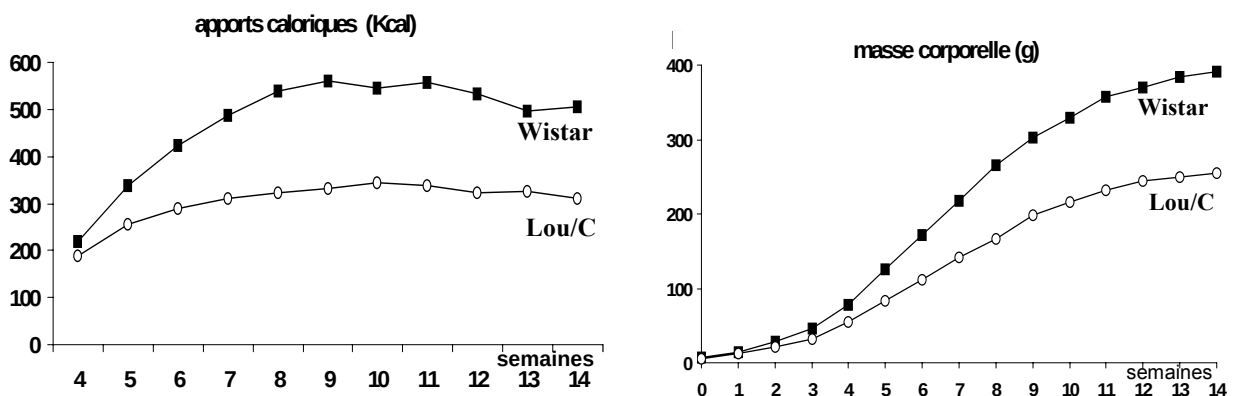


Figure 14 : Apports caloriques et masse corporelle de rats Wistar et Lou/C. D'après Couturier *et al*, 2002. Le ralentissement de la courbe de croissance des rats Lou/C comparativement aux rats Wistar est la conséquence d'une réduction spontanée de leur prise alimentaire.



Photo : Rats Lou/C et Wistar au même âge

D'autres particularités caractérisant les rats Lou/C rejoignent celles de rats soumis à une restriction calorique notamment une meilleure sensibilité à l'insuline (*Couturier et al, 2002 ; Perrin et al, 2003*) ainsi qu'une augmentation de la longévité (*Dodane et al, 1991 ; Veyrat-Durebex & Alliot, 1997*). En effet, les rats Lou/C présentent une espérance de vie médiane (50% de survivants) de 29 mois alors que celle des rats Wistar est de 24 mois (*Alliot et al, 2002 ; Zimmerman et al, 2003*).

Les rats Lou/C âgés de 6 et 12 mois ont une dépense énergétique supérieure à celle des Wistar, mais à partir de 18 mois, plus aucune différence n'est perceptible entre ces 2 souches (*Perrin et al, 2003*). La dépense énergétique est divisée en 3 composantes : le métabolisme de base, la thermogénèse et l'activité physique. Or, si le métabolisme basal n'a pas encore été déterminé chez le rat Lou/C, la thermogénèse du tissu adipeux brun de ces rats est plus élevée que celle de rats Fischer (*Abdoulaye et al, 2006*). De plus, ces animaux montrent une activité locomotrice spontanée pouvant atteindre plusieurs kilomètres par jour (*Servais et al, 2003*).

La souche de rat Lou/C représente donc un modèle original pour l'étude des mécanismes impliqués lors d'une restriction calorique de longue durée.

II.2. REGIME RICHE EN LIPIDES

La première conséquence visible d'un régime riche en lipides est un surcharge pondérale pouvant aller jusqu'à l'obésité. Les régimes alimentaires contenant plus de 30% des apports énergétiques sous forme de lipides entraînent en effet le développement d'une obésité chez les rats, les souris, les chiens et les primates, dû à une augmentation de la prise calorique (Hill *et al*, 2000 ; West and York, 1998). Ainsi, des rats Wistar soumis pendant 4 semaines à un régime composé de lipides comptant pour 60% des calories totales, ont une masse corporelle 20% supérieure à celle des rats soumis à un régime standard (12% de lipides) (Bartness *et al*, 1992). En revanche, ces animaux soumis à un régime contenant peu de lipides (< 20%) deviennent rarement obèses, même lorsqu'ils sont maintenus dans une petite cage limitant toute activité physique (Hill *et al*, 2000).

Toutefois, l'obésité n'est pas uniquement un problème de poids ; elle est également à l'origine de nombreuses pathologies, notamment le diabète de type 2 (Saltiel, 2000). L'accumulation des triglycérides dans le tissu adipeux stimule la lipolyse par un effet de masse et augmente ainsi la concentration en acides gras libres plasmatiques (Lewis *et al*, 2002 ; Nurjhan *et al*, 1992). Ce flux d'acides gras libres provoque alors de nombreux désordres métaboliques dont : 1°) une dyslipidémie et une stéatose hépatique, 2°) une détérioration du métabolisme du glucose et de la sensibilité à l'insuline dans le muscle squelettique et le foie, conduisant à la mise en place d'une résistance à cette hormone, 3°) une diminution de l'élimination de l'insuline, aggravant l'hyperinsulinémie et, 4°) un dysfonctionnement des cellule β -pancréatiques (figure 15) (Lewis *et al*, 2002, Reaven, 1988).

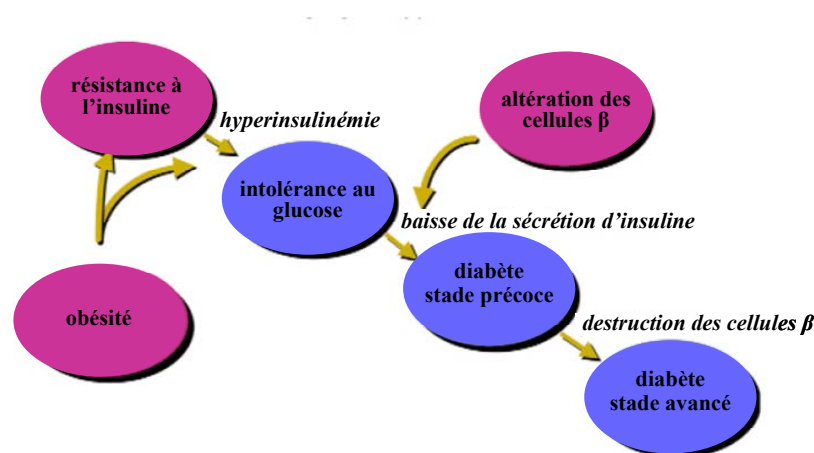


Figure 15 : Obésité et diabète de type 2. D'après Saltiel, 2000

Une consommation excessive de lipides va donc induire un déséquilibre du contenu plasmatique en acides gras libres et favoriser l'hyperglycémie, des conditions étant à l'origine d'une augmentation du stress oxydant (*Bakker et al, 2000 ; Bonnefont-Rousselot, 2002 ; Brownlee & Cerami, 1981 ; Evans et al, 2002 ; Paolisso et al, 1996 ; Rösen et al, 2001*).

L'importante quantité d'acides gras libres plasmatiques s'accompagne d'une accumulation d'acyl-CoA à chaîne longue (LC-CoA) dans les tissus due à une altération de l'oxydation des lipides (*Ellis et al, 2000 ; Laybutt et al, 1999 ; Perez-Carreras et al, 2003 ; Prentki et al, 1996*). Différentes études montrent que les LC-CoA inhibent l'ANT (*Adenine Nucleotide Translocator*), entravant l'entrée d'ADP dans la mitochondrie (*Paulson et al, 1984 ; Siboll et al, 1984*). La faible concentration en ADP intramitochondriale ralentit alors le processus d'oxydation phosphorylante avec pour conséquence une diminution de la respiration mitochondriale, une augmentation du potentiel de membrane ($\Delta\psi$) et de la production de ROS (*Boveris & Chance, 1973 ; Barja, 2002 ; Korshunov et al, 1997*). Dans le muscle squelettique et le foie de rats soumis à un régime riche en lipides, la respiration mitochondriale (état 4 et 3) est ainsi diminué comparativement à celle de rats soumis à un régime standard (*Iossa et al, 2000 ; Iossa et al, 2003 ; Shreekumar et al, 2002*). Cette diminution de la capacité d'oxydation phosphorylante est également révélée par la réduction de l'expression de gènes des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexe I, II, III et IV) ainsi que de leur activité (*Perez-Carreras et al, 2003 ; Simoneau et al, 1999 ; Sparks et al, 2005*).

Parallèlement à cela, la concentration élevée en glucose plasmatique active la glycolyse et stimule l'oxydation du pyruvate qui s'accompagne d'une augmentation du potentiel redox (NADH/NAD^+), du potentiel de membrane ($\Delta\psi$) et donc de la production de ROS. Par exemple, des cellules endothéliales aortiques incubées dans un milieu hyperglycémique (30 mM de glucose) produisent 3 fois plus de ROS que ces mêmes cellules incubées dans un milieu normoglycémique (5 mM de glucose) (*Nishikawa et al, 2000*). En outre, sur des cellules dépourvues de chaînes respiratoires fonctionnelles (p^o), une même production de ROS résiduelle est observée en hyperglycémie qu'en normoglycémie (*Brownlee, 2005*). Cette production de ROS est donc bien spécifique des mitochondries.

De plus, il est admis que la surproduction mitochondriale de ROS induite par la dyslipidémie et l'hyperglycémie déclenche une cascade de réactions amplifiant le niveau de stress oxydant à travers l'augmentation : 1°) de l'auto-oxydation du glucose, 2°) de la

glycation des protéines, 3°) de la voie des polyols, 4°) de l'activité de la Protéine Kinase C (PKC), ainsi que 5°) l'inhibition de la voie des pentoses phosphates (figure 16).

Différentes études démontrent en effet que les ROS favorisent l'auto-oxydation du glucose et la glycation des protéines (*Hunt et al, 1988 ; Wolff & Dean, 1987*). Mais ils altèrent également le métabolisme du glucose en inhibant la glycolyse par un rétrocontrôle négatif sur la glycéraldehyde phosphate déshydrogénase (GAPDH) (*Du et al, 2000 ; Leverve, 2003*). Cette diminution d'activité de la GAPDH entraîne une accumulation des trioses phosphates qui va augmenter la formation d'AGEs (*Advanced Glycation End*) et de diacylglycérol (DAG) (*Brownlee, 2001*). Les AGEs sont impliqués dans divers processus aggravant le stress oxydant, notamment l'activation de la NADPH oxydase (*Wautier et al, 2001*) et la peroxydation lipidique (*Yan et al, 1994*). Le DAG, quant à lui, active différentes réactions en chaîne dont celle de la PKC qui, entre autre, stimule la NADPH oxydase (*Inoguchi et al, 2000*). Les résultats de *Nishikawa et al (2000)* confirment ce lien entre la production mitochondriale de ROS, la glycation des protéines et l'activation de la voie PKC-dépendente. En effet, les cellules endothéliales aortiques incubées dans un milieu hyperglycémique (30mM de glucose) ont une augmentation conjointe de la production de ROS, de la quantité d'AGEs et de l'activité de la PKC. Inversement, l'ajout de découplant de la membrane mitochondriale (CCCP, UCP1) ou d'enzyme antioxydante (Mn-SOD), diminue ces 3 paramètres.

L'inhibition de la voie glycolytique par les ROS décrite précédemment engendre également une accumulation du glucose intracellulaire. Or, une concentration élevée de glucose active la voie des polyols (*Brownlee, 2001*) et inhibe la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) qui est la première étape de la voie des pentoses phosphates (*Zhang et al, 2000*). Comme la voie des polyols nécessite du NADPH pour la synthèse du sorbitol, une activation de cette voie entraîne la déplétion de ce coenzyme. L'inhibition de la voie des pentoses phosphates entraîne également une réduction de la production de NADPH. Ainsi, la quantité de NADPH disponible pour régénérer le GSSG en GSH est largement diminuée, réduisant considérablement le système de défense antioxydante non enzymatique (GSH) (*Dincer et al, 2002 ; Lee & Chung, 1999 ; Maddux et al, 2001 ; Paolisso et al, 1996*). Des diminutions en α -tocopherol (vitamine E) et en enzymes antioxydantes (GPx, GR et Cu/Zn-SOD, Mn-SOD) sont également observées (*Aliciguzel et al, 2003 ; Dincer et al, 2002 ; Roberts et al, 2006 ; Sreekumar et al, 2002a*).

Avec un régime riche en lipides, les dégâts cellulaires sont donc comparables à ceux provoqués par les ROS, à savoir une augmentation de la peroxydation lipidique, de l'oxydation des protéines et des dommages de l'ADN (*Evans et al, 2003 ; Lee & Chung, 1999 ; Nourooz-Zadeh et al, 1997 ; Paolisso et al, 1996 ; Roberts et al, 2006 ; Sreekumar et al, 2002a*). Cependant, *Ochoa et al (2003)* montrent que le degré de peroxydation lipidique dépend de la composition lipidique du régime. La peroxydation lipidique est en effet plus marquée chez des rats soumis à un régime riche en huile de tournesol (principalement constituée d'acides gras polyinsaturés) que chez ceux nourris avec un régime riche en huile d'olive (acides gras monoinsaturés). Ceci s'explique par le fait que la composition membranaire est modifiée selon la nature des acides gras proposés (*Andersson et al, 2002 ; Barzanti et al, 1994 ; Mataix et al, 1998 ; Quiles et al, 2001 ; Ochoa et al, 2003*). De ce fait, un régime riche en acides gras polyinsaturés augmente le degré d'insaturation des membranes mitochondriales qui deviennent alors plus sensible aux attaques radicalaires (*Gardner, 1989 ; Ochoa et al, 2003*). Le système antioxydant semble également varier avec la composition lipidique du régime. Le contenu en α -tocopherol (vitamine E) et l'activité de la catalase sont en effet plus faibles chez les rats soumis au régime riche en huile de tournesol qu'au régime riche en huile d'olive (*Ochoa et al, 2003*).

Le régime riche en lipides modifie également la composition protéique des membranes, l'augmentation des acides gras libres entraînant l'induction d'UCP3 dans le muscle squelettique (*Brun et al, 1999 ; Chou et al, 2001 ; Schrauwen et al, 2001a*). Cependant, dans le muscle squelettique des personnes diabétiques, les UCP3 sont diminuées de 50% par rapport à celles de personnes saines (*Krook et al, 1998 ; Schrauwen et al, 2001b*). Sachant que les UCP3 sont reconnus pour améliorer l'oxydation des lipides et ainsi détoxifier les mitochondries en acides gras anioniques (*Hesselink et al, 2003 ; Himms-Hagen & Harper, 2001 ; Schrauwen & Hesselink, 2002*), un défaut de leur expression peut donc faciliter la production de ROS (*Vidal-Puig et al, 2000*) s'accompagnant d'une peroxydation lipidique accrue.

De nombreuses études mettent en exergue une relation entre l'augmentation du stress oxydant et le développement de la résistance à l'insuline (figure 16) (*Ceriello, 2000 ; Evans et al, 2003 ; Maddux et al, 2001 ; Paolisso et al, 1996*). Ceci se caractérise par des altérations au niveau : 1°) des récepteurs à l'insuline et de ses substrats (IRS), 2°) des transporteurs du glucose stimulés par l'insuline (notamment GLUT-4 dans le muscle) et 3°) des fonctions des cellules β -pancréatiques. Plus précisément, l'activation de la PKC entraîne une

phosphorylation de résidus sérine/thréonine des IRS qui conduit à l'inactivation des récepteurs hormonaux (*Berti et al, 1994 ; Shulman, 2000 ; Yu et al, 2002*), inhibant ainsi la transmission du signal insulinémique et la capture cellulaire du glucose qui en découle (*Kahn, 1992 ; Shulman, 2000 ; Yu et al, 2002*). Ceci est conforté par Maddux *et al* (2001) qui observent sur des myotubes L6 surexprimant GLUT-4 une inhibition du transport du glucose stimulé par l'insuline après exposition de ces cellules à un stress oxydant. Enfin, dans les cellules β -pancréatiques, l'augmentation de la production de ROS induite par l'hyperglycémie est associée à une diminution de la sécrétion de l'insuline (*Maechler et al, 1999 ; Sakai et al, 2003*).

Par ailleurs, les cellules β -pancréatiques ont un faible pouvoir antioxydant avec des enzymes antioxydantes dont les activités sont de 70% à 95% inférieures à celles du foie, ce qui les rend plus vulnérables aux ROS (*Robertson et al, 2004 ; Tiedge et al, 1997*). De plus, la diminution de GSH observée chez les sujets diabétiques peut contribuer à l'altération de la sécrétion de l'insuline. En effet, la modification du rapport GSH/GSSG plasmatique affecte la réponse des cellules- β (*Ammon et al, 1989*). Ainsi, une concentration plasmatique élevée en acides gras libres et en glucose peut entraîner la destruction des cellules β -pancréatiques (*Evans et al, 2003*).

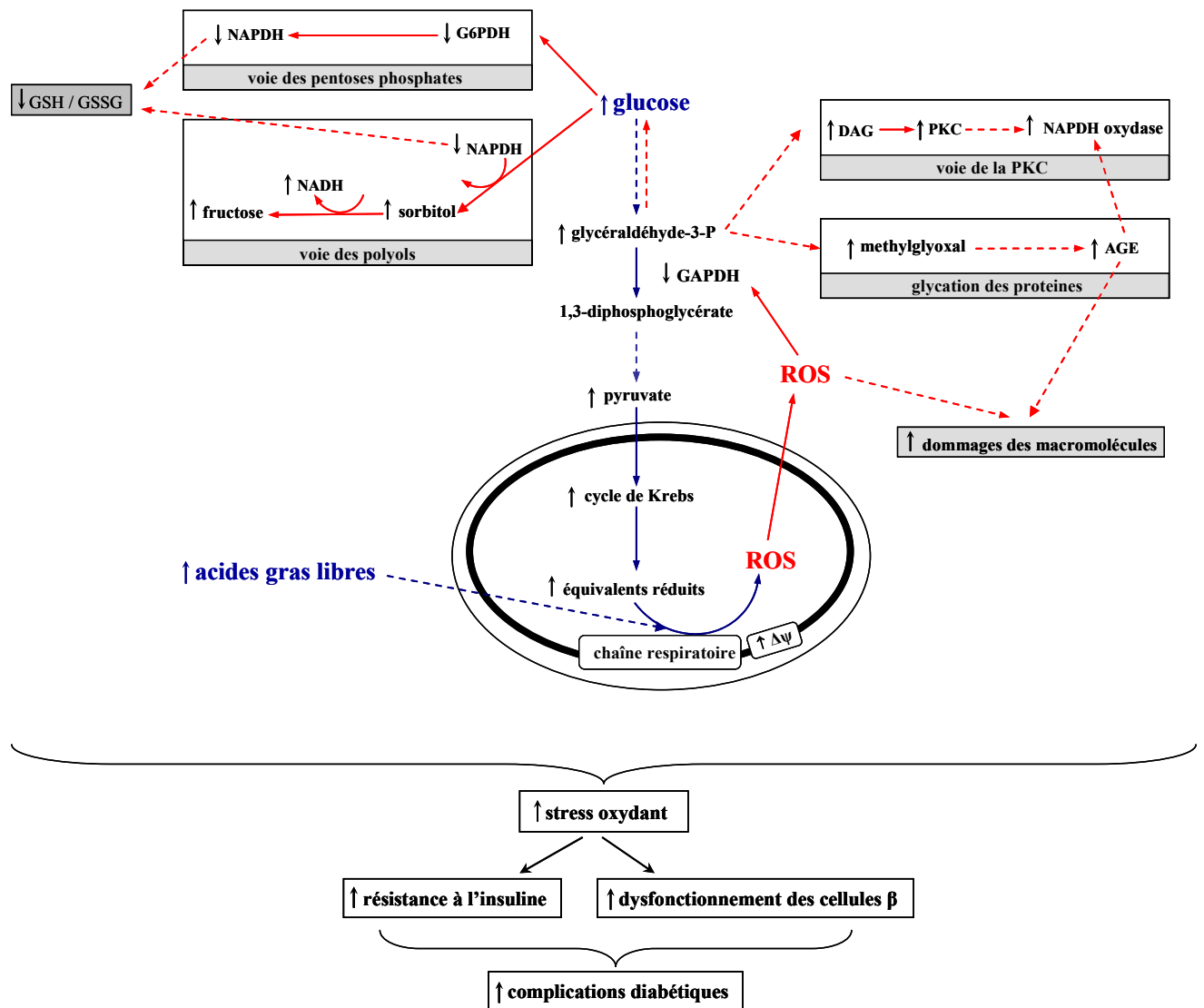


Figure 16 : Conséquence de la surproduction de ROS lors d'un régime riche en lipides.

($\rightarrow$ bleu) : réactions induites par la dyslipidémie et l'hyperglycémie, ($\rightarrow$ rouge) : réactions induites par les ROS. (AGE) : Advanced Glycation End ; (DAG) : diacylglycérol ; (GAPDH) : glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase, (G6PDH) : glucose-6-phosphate déshydrogénase, (PKC) : Pyruvate Kinase C.

II.3. REGIME RICHE EN SACCHAROSE / FRUCTOSE

Depuis quelques années, la proportion de glucides dans l'alimentation est augmentée et plus particulièrement celle en saccharose. Aux Etats-Unis, la consommation de glucides est passée en 25 ans de 42,4% à 49% kcal pour les hommes et de 44,8% à 49,7% kcal pour les femmes, ceci s'accompagnant d'une diminution de la consommation de lipides (de 36,9% à 32,8% pour les hommes et de 36,1% à 32,8% pour les femmes) (*Griel et al, 2006*). Or, un tel régime engendre des désordres métaboliques appelés Syndrome X (*Reaven, 1988*). Le Syndrome X est caractérisé par une hypertension, une résistance à l'insuline et une dyslipidémie, ou plus exactement une hypertriglyceridémie (*Gutman et al, 1987 ; Huang et al, 2004 ; Pagliassotti et al, 1996 ; Soria et al, 2001*).

Le saccharose est un disaccharide constitué d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose ; et c'est cette dernière molécule qui semble conditionner les désordres métaboliques. Cette spécificité du fructose est mise en évidence chez l'animal et plus précisément chez le rat (*Thoburn et al, 1989 ; Thresher et al, 2000*). Dans leur étude, *Thoburn et al (1989)* comparent un régime contenant 35% de fructose avec un autre contenant 35% de glucose et après 4 semaines de traitement, seuls les rats soumis au régime riche en fructose développent une résistance à l'insuline. *Thresher et al (2000)*, quant à eux, comparent 4 régimes avec une composition en glucides différente : un régime standard n'ayant comme source de glucides que de l'amidon, un régime avec 68% de saccharose, un régime avec 34% de fructose + 34% de glucose et un régime avec 34% de fructose + 34% d'amidon. Après 5 semaines de traitement, le régime fructose + amidon est capable de produire une intolérance au glucose similaire à celle induite par les régimes saccharose et fructose + glucose. Ainsi, le fructose est bien le principal médiateur de l'intolérance au glucose et de la résistance à l'insuline induite par le saccharose.

McDonald (1995) définit le stress oxydant comme étant l'un des mécanismes à l'origine des effets délétères induits par le fructose. Cependant, après 48h d'un régime riche en saccharose (75%), une stimulation des défenses antioxydantes est observée (*Spolarics, 1999 ; Spolarics & Meyenhofer, 2000*). Les activités de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) et du glutathion réduit (GSH) sont en effet augmentées dans différents types cellulaires du foie (cellules endothéliales sinusoïdales et cellules parenchymateuses) de ces rats. La G6PDH fournit du NADPH à la glutathion peroxydase (GPx) et peut également

initier l'augmentation du GSH. Tout ceci concourt à une meilleure détoxification de la cellule en convertissant l' H_2O_2 en H_2O . Par contre, dès la première semaine d'un régime riche en saccharose ou fructose, différents marqueurs reflètent une aggravation du stress oxydant, et ce à travers une diminution du contenu en glutathion réduit (GSH) et des enzymes antioxydantes (SOD, GPx, catalase) ainsi qu'une augmentation de la peroxydation lipidique (*Armutcu et al, 2005 ; Busserolles et al, 2002c ; Faure et al, 1997 ; Srividhya & Anuradha, 2002 ; Thirunavukkarasu & Anuradha, 2004*). En outre, après 2 semaines de régime riche en fructose (60%), la quantité de ROS produite est augmentée dans le cœur (*Delbosc et al, 2005*), mais ce résultat n'est pas retrouvé par *Busserolles et al (2002c)* investiguant pourtant le même tissu. Cette divergence pourrait s'expliquer par la mise en place de conditions expérimentales différentes. En effet, ces deux équipes n'utilisent pas 1°) la même souche de rat : Sprague-Dawley vs Wistar, 2°) le même type de régime : fructose 60% vs saccharose 65% (soit environ 2 fois moins de fructose), et 3°) la même technique de mesure.

Le fructose a 2 caractéristiques métaboliques essentielles : 1°) sa rapide captation par le foie qui possède un système enzymatique très actif pour le catabolisme du fructose (fructokinase, aldolase B et triokinase), et 2°) son entrée au niveau des triose-phosphates en évitant l'étape de régulation de la phosphofructokinase (*Mayes, 1993*). Toutes les voies métaboliques peuvent ainsi être sollicitées mais c'est celle de la néoglucogenèse qui est particulièrement activée (*Bizeau et al, 2001a et 2001b ; Commerford et al, 2002 ; Pagliassotti et al, 1994*). Nous pouvons donc penser que l'augmentation du stress oxydant observée lors d'un régime riche en fructose est liée, comme pour le régime riche en lipides, à une augmentation de la concentration plasmatique en glucose. Cependant, malgré une néoglucogenèse stimulée, la glycémie est maintenue dans un premier temps, probablement grâce à l'augmentation de l'insulinémie. L'hyperglycémie ne s'installe qu'après 15 semaines de régime et semble être la conséquence d'une détérioration de la sécrétion d'insuline (*Chicco et al, 2003*). L'augmentation du stress oxydant durant les 15 premières semaines de régime riche en saccharose/fructose ne peut donc être attribuée à l'hyperglycémie.

Néanmoins, lors d'un tel régime, la lipogenèse hépatique est également stimulée (*Cohen et al, 1972 ; Iritani, 1991*), entraînant une dyslipidémie caractérisée par une hypertriglycéridémie (*Mayes, 1993*). Dès la première semaine de régime, la quantité de triglycérides circulants est augmentée (*Delbosc et al, 2005*), et 3 semaines suffisent pour provoquer une hausse des acyl-CoA à chaîne longue (LC-CoA) dans le muscle squelettique (*Chicco et al, 2003*). Or, nous avons vu précédemment que les LC-CoA entraînent des

dysfonctionnements mitochondriaux pouvant conduire à une augmentation de la production de ROS (§ II.2). De plus, il est montré qu'un apport en oligofructose au cours d'un régime standard, mais également au cours d'un régime riche en fructose, diminue la quantité de triglycérides plasmatiques qui s'accompagne d'une diminution de la peroxydation lipidique (Busserolles *et al*, 2003 ; Delzenne & Kok, 1999 ; Kok *et al*, 1996a ; Kok *et al*, 1996b). Ceci suggère clairement une implication des acides gras libres dans l'augmentation du stress oxydant.

La dégradation du fructose épuise le phosphate inorganique cellulaire menant à l'inhibition de la phosphofructokinase (Vasdev *et al*, 2004). D'autres enzymes de la glycolyse, dont la GAPDH, ont une activité réduite (Zhao *et al*, 2000). Ceci concourt au blocage de la voie glycolytique, à une accumulation de glycéraldéhyde-3-phosphate (Donnelly *et al*, 1994 ; Schalkwijk *et al*, 2004) et à une orientation du glucose vers la voie des polyols (Bell *et al*, 2000 ; Vasdev *et al*, 2004). Ainsi, malgré une absence d'hyperglycémie, le processus de glycation des protéines est augmentée chez les rats soumis à un régime riche en saccharose/fructose (Bell *et al*, 2000 ; Faure *et al*, 1997 ; Levi & Werman, 1998 ; McDonald, 1995 ; Schalkwijk *et al*, 2004). Une augmentation de la quantité de DAG ainsi que des activités de la PKC (Donnelly *et al*, 1994) et de la NADPH oxydase sont également retrouvées (Delbosc *et al*, 2005 ; Kashiwagi *et al*, 1999). Parallèlement à cela, Cohen *et al* (1972) observent une augmentation de la G6PDH (voie des pentoses phosphates) dans le foie de rats soumis à un régime saccharose (72%) suggérant une disponibilité en NADPH accrue. Cependant, le contenu en GSH étant réduit (Faure *et al*, 1997 ; Srividhya & Anuradha, 2002 ; Thirunavukkarasu & Anuradha, 2004), le NADPH servirait donc à la NADPH oxydase. Ceci est confirmé par Delbosc *et al* (2005) qui considèrent l'activation de cette enzyme prooxydante comme étant à l'origine de l'importante production d'O₂^{•-} observée dans le cœur des rats soumis au régime riche en fructose. De plus, en réponse à 500 µM de NADH ou de NADPH, la quantité d'O₂^{•-} produite dans l'aorte de rats soumis à un régime riche en fructose double par rapport à celle de rats contrôles (Kashiwagi *et al*, 1999).

A ce jour, la production mitochondriale de ROS lors d'un régime riche en fructose n'est pas encore explorée bien que certains paramètres laissent à penser qu'elle soit modifiée. D'une part, l'oxydation du glucose est diminuée, notamment dans le foie et le muscle squelettique (Bender *et al*, 1970 ; Chicco *et al*, 2003 ; d'Alessandro *et al*, 2000), et ceci pourrait être le reflet d'une inhibition de la GAPDH par une surproduction de ROS. D'autre part, la respiration mitochondriale est altérée dès la première semaine de régime riche en

saccharose (68 %) (*Lambert et al, 2003*). L'oxydation phosphorylante est en effet diminuée lorsque les mitochondries sont incubées avec du pyruvate/malate (*McCusker et al, 1983 ; Lambert et al, 2003*), suggérant un dysfonctionnement mitochondrial.

Comme pour le régime riche en lipides, ce stress oxydant peut contribuer à la mise en place de la résistance à l'insuline. Il suffit respectivement d'1 semaine et de 2 semaines de régime à 68% de saccharose pour induire une insulino-résistance dans le foie puis dans le muscle squelettique (*Pagliassotti et al, 1996*). Ce lien entre la résistance à l'insuline et le stress oxydant induits par le régime riche en saccharose/fructose est confirmé par différentes études utilisant la metformine, un antidiabétique (*Faure et al, 1999 ; Srividhya & Anuradha, 2002*). Les rats soumis à un régime riche en fructose et traités à la metformine ont simultanément une amélioration de leur sensibilité à l'insuline et de leurs défenses antioxydantes. De plus, il est montré que, si la metformine n'a pas un pouvoir anti-radicalaire (*ROS scavenger*), elle inhibe partiellement (- 40%) le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale permettant ainsi de diminuer la production de ROS issue du flux inverse d'électrons (*Batandier et al, 2006 ; El-Mir et al, 2000*). Par ailleurs, Horton *et al* (1997) observent une absence de résistance à l'insuline chez les rats femelles même après 8 semaines de régime riche en saccharose (68%). Or, les rats femelles sont mieux protégés des effets prooxydants d'un tel régime que les rats mâles probablement en raison de leur statut hormonal (*Busserolles et al, 2002a*), l'oestrogène ayant un effet antioxydant de part sa similarité de structure avec celle de la vitamine E (en particulier par la présence d'un groupe hydroxyle) (*Green et al, 1997 ; Mendelsohn & Karas, 1999 ; Sugioka et al, 1987*). Enfin, il est montré que l'apport en vitamine E améliore les systèmes de défense antioxydante et la sensibilité à l'insuline chez les rats soumis à un régime riche en fructose (*Faure et al, 1997*).

III. L'HYPEROXIE

Outre la nature et la proportion des équivalents réduits, la concentration en oxygène peut moduler la production mitochondriale de ROS. En effet, la quantité d' $O_2^{\bullet-}$ issue de l'activité de la chaîne respiratoire est contrôlée par loi d'action de masse. Cette quantité d' $O_2^{\bullet-}$ augmente donc lorsque la concentration en oxygène augmente.

$$\frac{d[O_2^{\bullet-}]}{dt} = k[O_2][R^{\bullet}] \quad (R : \text{donneur d'électrons})$$

Ainsi, Boveris & Chance (1973) observent une production d' H_2O_2 dans les mitochondries de foie de rat et de cœur de pigeon qui croît linéairement avec l'augmentation de la concentration en O_2 (0 à 40%) imposée dans la cuve de mesure. Turrens *et al*, (1982) décrivent une production d' H_2O_2 biphasique dans les mitochondries de poumon de porc (figure 17) : 1°) de 0 à 60% d' O_2 , l'augmentation de la production de ROS est linéaire passant de 0 à 0,05 nmol d' H_2O_2 /min/mg, 2°) après 60% d' O_2 , l'augmentation de cette production devient drastique atteignant 0,19 nmol d' H_2O_2 /min/mg à 100% d' O_2 (figure 17) (Turrens *et al*, 1982). L'hypothèse émise pour expliquer cette rupture de pente serait des capacités de défenses antioxydantes qui deviendraient alors insuffisantes (Turrens *et al*, 1982 ; Jamieson *et al*, 1986).

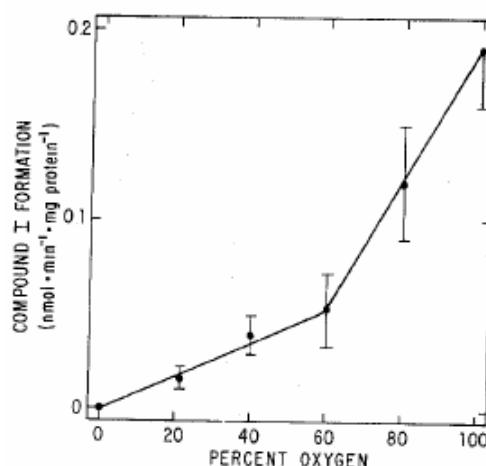


Figure 17 : Effets de la concentration l'oxygène sur la production d' H_2O_2 de mitochondries de poumon. D'après Turrens *et al*, 1982.

La production d' H_2O_2 est mesurée en présence de succinate (sans roténone). Cette production de ROS est biphasique.

III.1. HYPEROXIE SEVERE ($O_2 > 90\%$)

L'exposition à l'hyperoxie (augmentation de la fraction d' O_2) ou à l'hyperbarie (augmentation de la pression partielle d' O_2) est couramment utilisée en clinique lors de Syndrome de Détresse Respiratoire Aigue (SDRA), d'intoxication au CO ou au cyanure, de gangrène gazeuse (germe anaérobie strict) ou de cure d' O_2 pur. Et bien que cette exposition soit à but thérapeutique, elle n'engendre pas moins un stress oxydant. Il est en effet observé chez des personnes placées en caisson hyperbare une augmentation des dommages de l'ADN, de la peroxydation lipidique et du contenu en HSP70 (*Dennog et al, 1996 ; Dennog et al, 1999 ; Muth et al, 2004*). De ce fait, l' O_2 présente un grand paradoxe : si il est essentiel à la vie, il se révèle être également toxique. Gerschmann *et al* (1954) sont les premiers à attribuer cette toxicité de l'oxygène à une production accrue de radicaux libres, d'origine mitochondriale principalement. Les cellules p^o HeLa, caractérisées par une faible respiration mitochondriale comparativement aux cellules HeLa, ont en effet une meilleure tolérance à l'oxygène qui s'accompagne d'une diminution de la production de ROS (*Li et al, 2004*). Les mitochondries, garantes de l'efficacité du métabolisme en condition normoxique, sont donc de réels dangers lors d'expositions à l'hyperoxie.

L'organe le plus touché par cette toxicité de l' O_2 est le poumon dont les dommages peuvent aller jusqu'à la nécrose des cellules endothéliales (*Crapo, 1986*). Les échanges gazeux sont alors diminués. Dans les poumons de rats soumis à une hyperoxie sévère (O_2 à 85%) la production de ROS s'élève de 30% dès le premier jour d'exposition (*Evelson & Gonzalez-Flecha, 2000*). Une augmentation similaire est obtenue sur des cellules pulmonaires exposées à des concentrations croissantes en O_2 (*Freeman & Crapo, 1981 ; Zweier et al, 1989*). Cette augmentation de ROS a lieu bien que les défenses antioxydantes soient stimulées lors d'un hyperoxie sévère, notamment en enzymes antioxydantes (SOD, GPx, Catalase) (*Clerch & Massaro, 1993 ; Clerch et al, 1998 ; Crapo & Tierney, 1974 ; Evelson & Gonzalez-Flecha, 2000 ; Kimball et al, 1976*). Toutefois, les résultats divergent quant à la l'induction de l'activité de la SOD mitochondriale (Mn-SOD) par l'hyperoxie. Bien que la souche de rats utilisée dans ces différentes études soit la même, Kimball *et al* (1976) obtiennent une activation de la Mn-SOD pulmonaire alors que l'équipe de Clerch (1993 ; 1998) observe une inhibition. Cette contradiction peut s'expliquer par la différence de concentration d' O_2 imposée, aussi minime soit-elle : 90% vs 95%. Il est effectivement montré que l'espérance de vie des rats Sprague-Dawley mis en hyperoxie à 95% d' O_2 est de 70 à 75h

(Clerch & Massaro, 1993 ; Frank, 1982 ; Frank *et al*, 1989) alors qu'elle atteint respectivement 7 jours et 14 jours en hyperoxie à 90% et 85% d'O₂ (Kimball *et al*, 1976). Par conséquent, la diminution de 5% d'O₂ durant l'exposition à une hyperoxie sévère augmente considérablement l'espérance de vie des rats. De plus, le temps d'exposition peut également intervenir dans la différence d'activité de la Mn-SOD. En effet, l'équipe de Clerch (1993 ; 1998) observe une diminution de l'activité de la Mn-SOD dans le poumon après 48h et 60h d'hyperoxie à 95%, leurs études ne se prolongeant davantage dans le temps. Kimball *et al* (1976), quant à eux, obtiennent qu'une très légère augmentation après 3 jours d'hyperoxie à 90%. Ensuite, l'activité augmente drastiquement, devenant 2,5 fois plus importante au bout de 7 jours. Toutefois, les dégâts cellulaires sont observés dans les poumons de rats exposés à une hyperoxie sévère entraînant la formation d'un œdème (Clerch & Massaro, 1993 ; Evelson & Gonzalez-Flecha, 2000 ; Kimball *et al*, 1976). Ces données confirment que les défenses antioxydantes, bien que stimulées, sont insuffisantes pour contrecarrer la forte production de ROS induite par l'hyperoxie.

L'excès de ROS produit au niveau des mitochondries est donc prioritairement impliqué dans les mécanismes de dommages pulmonaires. Cependant, différentes études soulignent l'importance des enzymes cytochromes P450 (CYP) dans la mise en place de la toxicité de l'oxygène (Gonder *et al*, 1985 ; Moorthy *et al*, 1997 ; Moorthy *et al*, 2000 ; Okamoto *et al*, 1993). Chez des rats mis sous hyperoxie sévère (O₂>95%) pendant 48h, une augmentation des enzymes CYP est observée dans le poumon (Couroucli *et al*, 2002 ; Moorthy *et al*, 2000). Comme leur induction entraîne une augmentation de la production d'H₂O₂ et donc du stress oxydant (Morel *et al*, 1999), ces enzymes pourraient contribuer à la formation de ROS observée dans les poumons de rats et dans les cellules pulmonaires mis sous hyperoxie (Evelson & Gonzalez-Flecha, 2000 ; Freeman & Crapo, 1981 ; Zweier *et al*, 1989). Cette augmentation en enzymes CYP n'est pas spécifique au poumon, elle est également retrouvée dans le foie (Moorthy *et al*, 1997 ; Moorthy *et al*, 2000). Le niveau de CYP1A1/1A2, deux isoformes de CYP dans le foie, déclinant drastiquement entre 48h et 60h d'hyperoxie et ceci coïncidant avec le début de la détresse respiratoire observé chez ces rats, Moorthy *et al* (1997) en concluent que les altérations hépatiques contribuent aux mécanismes de dommages pulmonaires et/ou aux réponses adaptatives lors d'une exposition à l'hyperoxie. Ce lien entre des dysfonctionnements hépatiques et des anomalies pulmonaires est bien connu. Nous le retrouvons en effet dans le cas du syndrome hépatopulmonaire ou lors de l'ischémie-reperfusion du foie qui génère des dommages pulmonaires par un processus inflammatoire

(Colletti et al, 1995 ; Okaya et al, 2004). A partir de ces résultats, différentes études se sont alors penchées sur les réponses hépatiques de rats soumis à l'hyperoxie. Dans cet organe, une augmentation de la production d'H₂O₂ (Boveris & Chance, 1973) est observée ainsi que différents marqueurs du stress oxydant dont une augmentation de la peroxydation lipidique (Ban et al, 2002 ; Coupland et al, 1969) et une diminution de la concentration en glutathion réduit (GSH) (Coupland et al, 1969 ; Miralles et al, 2000 ; Malleske et al, 2006 ; Rusakow et al, 1993 ; Wong et al, 2001). Les mécanismes responsables de cette faible quantité de GSH hépatique ne semblent pas altérer les activités de la glutathion peroxydase (GPx) ou de la glutathion-S-transferase (GST) (Di Ilio et al, 1996 ; Moorthy et al, 1997). Par contre, le foie semble être l'organe central dans l'homéostasie inter-organe du GSH (Ookhtens & Kaplowitz, 1998). Ainsi, l'épuisement du GSH dans le foie pourrait être dû à sa libération vers les autres organes afin d'y maintenir une certaine concentration de glutathion, notamment dans les poumons (Lauterburg et al, 1984 ; Wong et al, 2001). En effet, aucune altération du contenu en GSH est observée dans les poumons de souris exposées à une hyperoxie 95% (Malleske et al, 2006), il est même légèrement augmenté dans ceux de rats exposés à 90% d'O₂ (Kimball et al, 1976). Ceci renforce l'hypothèse de l'importance du foie dans le processus d'intolérance à l'oxygène.

Bien qu'elle soit utilisée en traitement lors de pathologies respiratoires, l'exposition à l'hyperoxie/hyperbarie peut donc être à l'origine d'importantes séquelles. Celles-ci sont notamment observées chez des rats présentant spontanément une déficience respiratoire et dont l'exposition à l'hyperoxie (O₂>90% pendant 72h) augmente l'oxydation du système endogène des agents tensio-actifs dans les poumons (Zenri et al, 2004). Ceci a pour conséquence de diminuer la compliance pulmonaire.

En outre, d'autres études montrent qu'une exposition à l'hyperoxie peut aussi avoir des effets bénéfiques lors de transplantation d'organes. Cette exposition à l'oxygène atténue les effets délétères observés lors de la reperfusion (Nagamine et al, 2004 ; Tähepöld et al, 2001 ; Özden et al, 2004), résultant d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres et les défenses antioxydantes (Bilzer & Gerbes, 2000 ; Lentsch et al, 2000).

III.2. PRECONDITIONNEMENT HYPEROXIQUE

Comme nous venons de le décrire, l'espérance de vie de rats Sprague-Dawley mis en hyperoxie sévère ($O_2 > 95\%$) est très limitée : de 70 à 75h (Clerch *et al*, 1993 ; Frank, 1982 ; Frank *et al*, 1989). Il est toutefois possible d'augmenter leur survie en les soumettant préalablement à une phase de preconditionnement. Dans la littérature, divers protocoles de preconditionnement existent : des preconditionnements en hypoxie (Frank, 1982), en hyperoxie (Frank *et al*, 1989 ; Clerch *et al*, 1998) ou à l'ozone (Jackson & Frank, 1984). Mais tous ces protocoles de preconditionnement montrent que l'augmentation de la survie des rats soumis à une hyperoxie sévère est étroitement corrélée à l'augmentation des défenses antioxydantes (SOD, catalase et GPx) (figure 18).

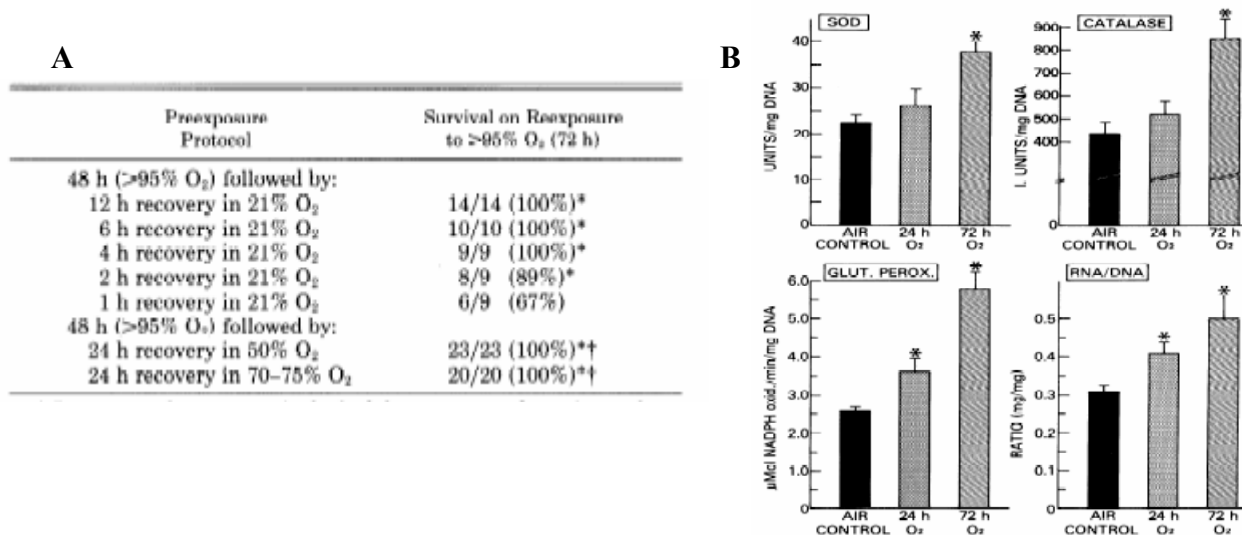


Figure 18 : Effets de preconditionnements sur la survie en hyperoxie sévère et sur les enzymes antioxydantes. D'après Frank *et al*, 1989. (A) Taux de survie après différents protocoles de preconditionnements sur des rats - (B) Activités d'enzymes antioxydantes dans le poumon de rats ayant été exposés 48h à 95% d' O_2 suivi de 24h en normoxie puis de 72h à 95% d' O_2 .

Différents protocoles de preconditionnement permettent d'augmenter le taux de survie lors d'une exposition en hyperoxie sévère. Cette augmentation du taux de survie est corrélée à une augmentation de l'activité d'enzymes antioxydantes.

Par ailleurs, différentes études montrent que la tolérance à l'oxygène est beaucoup plus dépendante de la SOD que des autres enzymes antioxydantes (Barja de Quiroga *et al*, 1984 ; Crapo & Tierney, 1974). Une diminution de l'activité de cette enzyme chez des rats tolérants à l'oxygène s'accompagne généralement d'une perte de cette tolérance (Crapo & Tierney,

1974). De plus, des études menées sur des rats transgéniques démontrent que c'est la SOD mitochondriale (Mn-SOD) et non cytosolique (Cu/Zn-SOD) qui est responsable de cette adaptation. En effet, sous hyperoxie sévère, les rats surexprimant la Mn-SOD survivent plus longtemps (216h) que les souris standard (90h) (*Ho et al, 1998 ; Wispé et al, 1992*). Or, seule l'activité de cette enzyme mitochondriale est augmentée dans les poumons de ces souris transgéniques, les autres enzymes antioxydantes (Cu/Zn-SOD, GPx et Catalase) n'étant pas affectées. Par contre, les souris surexprimant la Cu/Zn-SOD ont certes une augmentation de cette enzyme mais aussi une stimulation des autres systèmes antioxydants (GPx, G6PDH) (*White et al, 1991*). Ainsi, leur tolérance à l'oxygène ne peut être uniquement attribuée à la SOD cytosolique mais à une augmentation globale de leur défense antioxydante.

IV. SUPPLEMENTATION EN ANTIOXYDANTS ET GLISODIN®

Nous venons de caractériser le stress oxydant comme étant le facteur majeur dans les effets délétères liés aux désordres nutritionnels ou à l'hyperoxie. Afin de rétablir la balance stress oxydant/défenses antioxydantes, il paraît judicieux de renforcer les défenses naturelles de l'organisme par des apports en antioxydants exogènes.

IV.1. SUPPLEMENTATION EN ANTIOXYDANTS

La supplémentation en agents antioxydants la plus courante pour pallier aux désordres nutritionnels (syndrome X, diabète de type 2) est celle en vitamine E (*Faure et al, 1997 ; Gökkusu et al, 2001 ; Hong et al, 2004 ; Paolisso et al, 1993 ; Sharma et al, 2000*). D'une part, la vitamine E est reconnue comme étant un des principaux antioxydants naturels (*Green et al, 2004 ; Vasdev et al, 2004*). D'autre part, une faible concentration plasmatique en vitamine E semble augmenter le risque de développer un diabète de type 2 (*Salonen et al, 1995*). La supplémentation en vitamine E dans le cadre des pathologies associées à une résistance à l'insuline entraîne une augmentation des défenses antioxydantes non-enzymatiques (vitamine E, GSH) et enzymatiques (SOD, GPx) (*Faure et al, 1997 ; Gökkusu et al, 2001 ; Sharma et al, 2000*), le tout accompagné d'une diminution de la peroxydation lipidique. La fluidité membranaire est alors restaurée, préservant ainsi les fonctions biologiques de l'insuline (*Hong et al, 2004*). Cette diminution du stress oxydant est donc corrélée à une amélioration de la sensibilité à cette hormone hypoglycémiante (*Faure et al, 1997 ; Gökkusu et al, 2001 ; Paolisso et al, 1993*). D'autres suppléments en système antioxydant non enzymatique sont réalisées (vitamine C, coenzyme Q, acide α -lipoléique) et présentent des effets similaires à ceux obtenus avec la vitamine E (*Green et al, 2004 ; Sindhu et al, 2004 ; Thirunavukkarasu & Anuradha, 2004 ; Vasdev et al, 2004*).

L'utilisation d'enzymes antioxydantes extraites de plantes est vouée à l'échec en raison d'une rapide dégradation et inactivation par le processus de digestion (*Giri & Misra, 1984 ; Regnault et al, 1996 ; Vouldoukis et al, 2004b ; Zidenberg-Cherr et al, 1983*). Toutefois, la synthèse d'enzymes antioxydantes artificielles est développée et différentes études utilisent le tempol, un analogue de la SOD perméable aux membranes (*Charloux et al, 1995 ; Chen et al, 2003c*). L'apport de tempol chez des rats diabétiques réduit la production d'O₂^{•-}, l'activité de la

PKC ainsi que l'oxydation et la glycation des protéines (*Banday et al, 2005 ; Nassar et al, 2002*). Ceci s'accompagne d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline, d'une diminution de la concentration en triglycérides circulants et d'une normalisation de la glycémie (*Banday et al, 2005*). L'apport en enzymes antioxydantes dans les cellules β -pancréatiques pourrait représenter une approche thérapeutique intéressante en vue d'une protection contre la progression du diabète de type 2. En effet, des cellules en culture sécrétant de l'insuline (RINm5F, îlots pancréatiques) et surexprimant des enzymes antioxydantes (SOD, GPx, catalase) montrent une meilleure résistance au stress oxydant induit par divers facteurs (H_2O_2 , hypoxanthine/xanthine oxydase, hypoxie) (*Myrose et al, 2005 ; Tiedge et al, 1998*).

La supplémentation en vitamine E, si elle est efficace lors de pathologies caractérisées par une résistance à l'insuline, ne semble pas diminuer les effets délétères induits par l'hyperoxie (*Berger et al, 1998 ; Dennog et al, 1999 ; Kennedy et al, 1990*). Comme les bienfaits d'un préconditionnement à l'hyperoxie demeurent fortement liés à une augmentation de l'activité d'enzymes antioxydantes, différentes études mettent à l'épreuve une supplémentation en SOD et/ou catalase. (*Freeman et al, 1983 ; Padmanabhan et al, 1985 ; Turrens et al, 1984*). L'injection de ces enzymes antioxydantes d'origine bovine montre des résultats concluants avec une augmentation du taux de survie des rats exposés à une hyperoxie sévère ($O_2 > 95\%$) (figure 19) (*Padmanabhan et al, 1985 ; Turrens et al, 1984*). L'efficacité d'un tel traitement est davantage améliorée si les enzymes sont encapsulées dans des liposomes. En effet, ces derniers augmentent considérablement le temps de demi-vie de ces enzymes, la demi-vie de la SOD dans le sang passant de 8min à 4h20 et celle de la catalase de 20min à 2h40 (*Turrens et al, 1984*). Cependant, bien que les liposomes contiennent à la fois de la SOD et de la catalase, seule une augmentation de la quantité de SOD est retrouvée dans les poumons de rats traités comparativement aux ceux des rats non traités (*Turrens et al, 1984*). La quantité de catalase est comparable dans les 2 groupes, probablement à cause d'une vitesse d'élimination plus rapide.

Ces travaux confirment l'importance des enzymes antioxydantes et plus spécifiquement de la SOD dans la tolérance à l'oxygène.

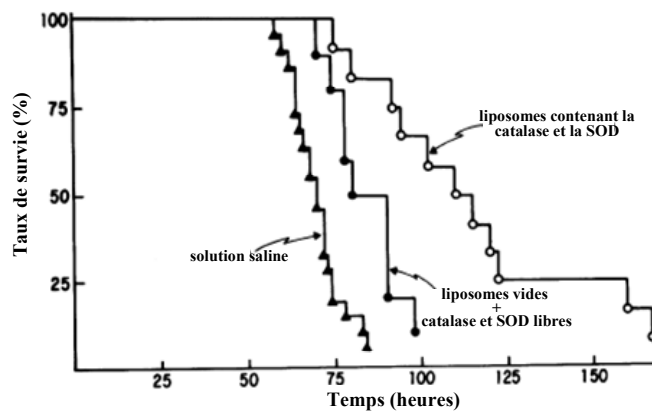


Figure 19 : Taux de survie de rats exposés à une hyperoxie sévère (> 95% d'O₂) ayant été ou non préalablement traités avec de la SOD et de la catalase. D'après Turrens *et al*, 1984.

L'injection préalable d'enzymes antioxydantes (SOD et catalase) permet d'augmenter le taux de survie lors d'une exposition en hyperoxie sévère.

IV.2. GLISODIN®

Nous venons de voir que la supplémentation en SOD joue un rôle capital dans la diminution des effets délétères induits par le régime alimentaire et par l'oxygène.

Cependant, un traitement oral à la SOD reste inefficace lorsque l'enzyme n'est pas protégée car elle est rapidement dégradée durant le transit gastro-intestinal (*Giri & Misra, 1984 ; Regnault et al, 1996 ; Zidenberg-Cherr et al, 1983*). En effet, l'activité de la SOD devient quasiment nulle après 5min d'exposition dans un milieu mimant le processus de digestion (*Vouldoukis et al, 2004b*). Il existe actuellement une nouvelle formule nutritionnelle contenant de la SOD végétale (issue du melon) combinée avec de la gliadine de blé : la GliSODin® (Isocell). D'une part, cette SOD extraite du melon *Cucumis melo LC* a une activité qui est 5 à 7 fois plus importante que celle extraite du melon classique "charentais" (*Vouldoukis et al, 2004a*). D'autre part, la gliadine est un biopolymère qui protège les molécules actives contre la digestion (*Mauguet et al, 2002 ; Renard et al, 2002*). L'activité de la SOD issus de la GliSODin® augmente en effet significativement et progressivement dans un milieu mimant le processus de digestion (*Vouldoukis et al, 2004b*). Il est récemment montré que la gliadine est capable d'activer la libération de zonuline par les cellules épithéliales intestinales (*Clemente et al, 2003*). Or, la zonuline intervient dans les processus augmentant la perméabilité intestinale (*Fasano et al, 2000 ; Wang et al, 2000*). La gliadine, en interagissant avec la barrière épithéliale intestinale, permettrait la libération de molécules actives au niveau des muqueuses (*Ezpeleta et al, 1999 ; Fasano et al, 2000*). La SOD pourrait ainsi atteindre la circulation sanguine.

Chez des souris traitées à la GliSODin® (1mg/jour/souris), l'activité de la SOD est augmentée de 80% dans le sang après 14 jours de traitement et elle est multipliée par 4 dans le foie au bout de 21 jours (*Voudoukakis et al, 2004b*). Après 28 jours de traitement, les activités de la GPx et de la catalase sont à leur tour stimulées dans le sang et le foie. Ainsi, afin de connaître les effets protecteurs de la GliSODin®, les globules rouges, les hépatocytes et les macrophages sont exposés à des stress oxydants exogènes (générateur de ROS, de peroxy-nitrite...) (*Voudoukakis et al, 2004a, Voudoukakis et al, 2004b*). Il en ressort que, chez les souris traitées : 1°) les globules rouges sont moins susceptibles à l'hémolyse, 2°) le pourcentage d'hépatocytes morts par apoptose est plus faible, et 3°) les macrophages produisent moins de radicaux libres superoxydes, nitrites et peroxy-nitrites.

La GliSODin® entraîne donc une meilleure résistance contre le stress oxydant. Mais parallèlement à ce pouvoir antioxydant, la GliSODin® a aussi un pouvoir anti-inflammatoire. Chez des souris traitées pendant 28 jours, la réponse immunitaire innée est renforcée par l'augmentation de la production de cytokine anti-inflammatoire (*Voudoukakis et al, 2004a*). De plus, la progression de tumeurs favorisées par l'inflammation est inhibée par la GliSODin® (*Okada et al, 2006*).

Des études préliminaires ont également été conduites afin de déterminer les effets de la GliSODin® dans le contexte du diabète de type 2 et de l'exposition à l'hyperbarie.

Naito *et al* (2005) ont orienté leur recherche sur la néphropathie, l'une des multiples complications liées au diabète de type 2. Les souris db/db, un modèle de rongeurs de diabète de type 2, développent une néphropathie à l'âge de 10 semaines. Ceci se caractérise par une augmentation d'albumine dans les urines mais aussi de 8-OHdG (oxydation de l'ADN) qui est considéré comme un bon marqueur du stress oxydant au niveau du rein. Après 12 semaines de traitement à la GliSODin®, les quantités d'albumine et de 8-OHdG dans les urines sont diminuées de 40% chez les souris traitées comparativement aux souris non traitées. Cependant, la concentration plasmatique en glucose ainsi que les fonctions des cellules β -pancréatiques ne sont pas affectées. La protection rénale chez les souris db/db traitées à la GliSODin® ne peut donc être attribuée à une diminution de l'hyperglycémie. Ceci suggère que la GliSODin® peut atténuer directement les dommages oxydatifs induits par cette hyperglycémie.

Muth *et al* (2004), quant à eux, se sont intéressés aux effets de la GliSODin® lors d'une exposition à une hyperbarie. 2 groupes d'individus sont constitués : 1 groupe de personnes traitées à la GliSODin® pendant 2 semaines et 1 groupe de personnes non traitées.

En normoxie, après les 2 semaines de traitement, le statut antioxydant (Cu/Zn-SOD, catalase, GPx, GSH), les dommages de l'ADN et la peroxydation lipidique ne sont pas significativement différents chez les personnes traitées comparativement aux personnes non traitées. Après l'exposition à l'hyperbarie, le statut antioxydant n'est altéré dans aucun des 2 groupes. Par contre, l'hyperbarie entraîne une augmentation des dommages de l'ADN et de la peroxydation lipidique chez les personnes non traitées, ce qui n'est pas le cas chez les personnes traitées à la GliSODin®. Ceci confirme l'effet protecteur de la GliSODin® contre les dégâts induits par le stress oxydant.

Tenant compte de l'ensemble de ces découvertes, il paraît donc opportun de poursuivre ces investigations afin de mieux connaître le mode d'action de la GliSODin® et permettre ainsi son utilisation dans un but thérapeutique.

V. ORIENTATION DU TRAVAIL

Cette revue de littérature a permis de montrer que le stress oxydant était modulé par la nature et la proportion des équivalents réduits fournis à la chaîne respiratoire mitochondriale (régimes alimentaires) mais aussi par la concentration en oxygène (hyperoxie). Dans ces différents contextes, nous avons étudié le rôle joué par les mitochondries sur la production d'H₂O₂ musculaire et/ou hépatique.

Ce travail de thèse repose sur 3 études, les 2 premières considérant les régimes alimentaires et la dernière, l'hyperoxie.

Dans l'étude I, nous nous sommes intéressés à la production de ROS par les mitochondries de muscle squelettique des rats Lou/C. Cette souche a en effet une prise alimentaire spontanément réduite par rapport à celle du rat Wistar (souche dont sont issus les Lou/C). De plus, nous avons évalué les conséquences d'une consommation accrue en lipides chez ces rats Lou/C.

L'étude II concerne les effets d'un régime riche en fructose sur le fonctionnement mitochondrial de foie et de muscle squelettique de rats Wistar. Une supplémentation en GliSODin[®] a été également effectuée afin de définir si cet apport en antioxydant peut diminuer la production de ROS induite par un tel régime.

Enfin, si l'exposition en hyperoxie sévère entraîne la mort des rats au bout de quelques heures, il est montré que deux méthodes peuvent prolonger leur survie : le préconditionnement en hyperoxie et la prise d'antioxydants. Ainsi, nous nous sommes proposé de comparer un protocole de préconditionnement hyperoxique (4 jours à 50% d'O₂ suivi de 4 jours à 80 d'O₂) avec la supplémentation en GliSODin[®] afin de déterminer si les mécanismes mis en place sont similaires.

MATERIEL & METHODES

I. ANIMAUX

Les rats utilisés au cours des différentes études sont de souche Wistar ou Lou/C. Afin d'éviter les variabilités inter-sexe, nous n'avons utilisé que des rats mâles. Les rats sont maintenus dans l'animalerie du laboratoire où règne une température constante ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) et un éclairage qui varie selon un rythme circadien 12 h jour : 12h nuit (7h-19h). Les animaux ont accès à volonté à la nourriture et à la boisson.

I.1. ETUDE I

3 groupes expérimentaux sont constitués :

Tableau 1 : Composition des groupes expérimentaux des rats Wistar et Lou/C

Wistar	rats Wistar soumis à un régime standard (High Carbohydrate, HC)
Lou/C-HC	rats Lou/C soumis à un régime standard (High Carbohydrate, HC)
Lou/C-HF	rats Lou/C soumis à un régime standard riche en lipides (High Fat, HF)

Les rats de souche Wistar et Lou/C sont placés dans des cages individuelles afin de mesurer leur prise alimentaire. Les régimes (standard ou riche en lipides) sont fournis pendant 8 semaines.

Tableau 2 : Composition des régimes

	HC (g/ 100g poids sec)	HF (g/ 100g poids sec)
Amidon	62	0
Caséine	22,7	30
Huiles végétales	4,5	5
Lard	0	48
Vitamine –Minéraux	6,25	7
Cellulose	4,5	10
Valeur énergétique Kcal/100g	379	597

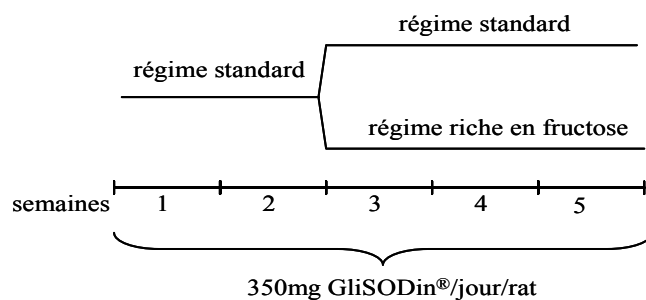
I.2. ETUDE II

4 groupes expérimentaux sont constitués :

Tableau 3 : Composition des groupes expérimentaux des rats Wistars.

CHO	rats Wistar soumis à un régime standard riche en glucides
FD	rats Wistar soumis à un régime standard riche en fructose (65%)
CHO+SOD	rats Wistar soumis à un régime standard riche en glucides + GliSODin [®]
FD+SOD	rats Wistar soumis à un régime standard riche en fructose (65%) + GliSODin [®]

Les rats Wistars sont placés dans des cages individuelles afin de mesurer leur prise alimentaire. Les régimes (standard ou riche en fructose) sont fournis pendant 3 semaines. Les rats traités à la GliSODin[®] sont gavés avec 350mg/jour de ce complément alimentaire (sauf les week-end) pendant 5 semaines selon le protocole suivant :



La GliSODin[®] est un complément alimentaire antioxydant produit par la société Isocell, elle est constitué de SOD de melon enrobée par de la gliadine de blé.

Tableau 4 : Composition des régimes

	CHO (g/ 100g poids sec)	FD (g/ 100g poids sec)
Amidon	62	0
Fructose	0	65
Caséine	22,7	20
Huiles végétales	4,5	5
Vitamine –Minéraux	6,25	5
Cellulose	4,5	5
Valeur énergétique Kcal/100g	379	385

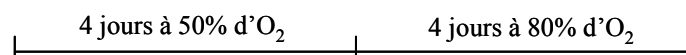
I.3. ETUDE III

3 groupes expérimentaux sont constitués :

Tableau 5 : Composition des groupes expérimentaux des rats Wistars

Normoxie	rats Wistar en condition standard (contrôle)
Hyperoxie	rats Wistar soumis au préconditionnement hyperoxique
SOD	rats Wistar traités à la GliSODin® (en normoxie)

Le protocole de préconditionnement hyperoxique sur les rats Wistars est mis en place au sein même de notre laboratoire et est déterminé afin d'obtenir un taux de survie de 100% après 60h d'hyperoxie sévère ($O_2 > 92\%$). Le protocole de préconditionnement hyperoxique retenu correspond à :



Les rats traités à la GliSODin® sont gavés avec 350mg/jours de ce complément alimentaire (sauf le week-end) pendant 3 semaines.

II. DEPENSE ENERGETIQUE ET ACTIVITE LOCOMOTRICE

Les mesures de la dépense énergétique et l'activité locomotrice (étude 1) ont été réalisées au laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire – UMR 5123 (Lyon).

La dépense énergétique est mesurée par calorimétrie indirecte, la chaleur produite par les processus métaboliques pouvant être calculée à partir des échanges gazeux.

Les rats Wistar et Lou/C-HC sont placés individuellement dans des chambres de respiration, leur dépense énergétique est déterminée à partir de leur consommation d' O_2 et de leur rejet de CO_2 . Le pourcentage d' O_2 dans l'air est mesuré par un analyseur paramagnétique et le pourcentage de CO_2 par un analyseur de gaz infrarouge. Les mesures sont effectuées pendant 24h avec une période d'habitation d'au moins 4h. La dépense énergétique totale est calculée à

chaque heure, la phase nocturne étant comprise entre 19h et 7h. Durant la collecte des données, les rats sont nourris *ad libitum* et sont soumis à la même photopériode de 12h jour : 12 h nuit et maintenus la même température que celles des installations de l'animalerie.

Afin de pouvoir comparer les données entre deux rats de corpulence différente, les valeurs de métabolisme tiennent compte de la masse active des animaux. Une approximation de cette masse active est obtenue en prenant le poids des animaux élevé à la puissance 0,75. Ainsi la de la dépense énergétique est exprimée en Watt/kg^{0,75}.

Les activités locomotrices des rats Wistar et Lou/C-HC sont mesurées à l'aide d'un actimètre comportant des "baguettes" infrarouges (capteurs de mouvement). L'ordinateur relié à l'actimètre comptabilise le nombre de va-et-vient, de mouvements à l'avant et à l'arrière de la cage ainsi que le nombre de redressements effectués par l'animal.

III. PREPARATIONS DES MITOCHONDRIES ISOLEES

Les prélèvements sont effectués en chambre froide à 4°C. L'anesthésie modifiant les propriétés des mitochondries, les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale ou par décapitation. Les muscles gastrocnémiens rouges des deux pattes (étude 1 et 2) ainsi qu'une portion de foie (étude 2 et 3) clampée sont récupérés, immergés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C pour des dosages ultérieurs.

L'isolement des mitochondries repose sur une technique de fractionnement des composés cellulaires par centrifugation différentielle.

III.1. HOMOGENATS DE MUSCLE SQUELETTIQUE

Le muscle oxydatif quadriceps des deux pattes postérieures est prélevé et immergé dans du tampon d'isolement à 4°C (saccharose 150 mM, KCl 75 mM, Tris-Base 50 mM, KH₂PO₄ 1mM, MgCl₂ 5 mM, EGTA 1 mM, pH 7,4). Il est émincé dans 30 mL de ce même tampon

d'isolement supplémenté par 0,2% d'albumine bovine sérique (BSA) délipidée. Les myofibrilles sont dissociées par incubation avec une protéase (Subtilisin 0,2%). Le tissu est homogénéisé dans un Potter Eljevehm. L'activité de la protéase est stoppée en diluant cet homogénat avec 2 volumes de tampon sans protéase.

III.2. HOMOGENATS DE FOIE

Le foie est excisé et refroidi par immersion dans du tampon d'isolement à 4°C (saccharose 250 mM, Tris-Base 20 mM, EGTA 1 mM, pH 7,4). Il est découpé en petits morceaux qui sont rincés abondamment avec ce même tampon pour éliminer le maximum d'hématies. Le tissu est homogénéisé dans un Potter Eljevehm.

III.3 ISOLEMENT DES MITOCHONDRIES

Les homogénats de muscle squelettique et de foie sont centrifugés à 800 g pendant 10 min à 4°C. A la suite de cette première centrifugation à basse vitesse, permettant d'éliminer les gros débris cellulaires, le surnageant est récupéré et centrifugé à 8000 g pendant 10 min à 4°C. Le culot mitochondrial ainsi obtenu est remis en suspension dans le tampon "stock" (saccharose 250 mM, Tris-Base 10 mM, EGTA 0,1 mM, pH 7,4). Cette suspension est de nouveau centrifugée à 8000 g pendant 10 min à 4°C. Le culot contenant les mitochondries est alors repris dans un volume minimum de ce même tampon stock (300 µL pour le muscle, 500 µL pour le foie) et conservé à 4°C.

La concentration protéique de la suspension mitochondriale est mesurée par la technique de Pierce basée sur l'utilisation de l'acide bicinchoninique. Une gamme étalon est conjointement établie avec la BSA comme protéine de référence. 25 µL d'échantillon (dilution au 50^{ème} pour le muscle et au 100^{ème} pour le foie) sont mélangés à 200 µL de réactif de Pierce. L'ensemble est incubé 30 min dans une étuve à 37°C. La lecture des dosages se fait à l'aide du logiciel informatique KC Junior, les résultats sont exprimés en mg/mL.

Après les différentes mesures de respiration mitochondriale, de production de ROS et d'ouverture de pore de transition de perméabilité, les mitochondries sont conservées à -80°C afin de pouvoir effectuer des dosages enzymatiques et de contenu en cytochromes.

IV. RESPIRATION MITOCHONDRIALE

La consommation d'oxygène par les mitochondries isolées est mesurée dans une chambre d'oxygraphie thermostatée (30°C), fermée et agitée, munie d'une électrode de Clark mesurant en continue la concentration d'oxygène dans le milieu. L'électrode de Clark est composée d'une cathode en platine polarisée à 0,7 Volts et d'une anode en argent, immergées dans une solution à demi-saturée de KCl. Celles-ci sont isolées de la cuve de mesure par une membrane de téflon laissant diffuser l'oxygène. Dans ces conditions, les variations du courant induit par la réduction de l'oxygène au niveau de la cathode sont directement proportionnelles aux variations de la quantité d'oxygène dissoute dans le milieu d'incubation. La mesure est effectuée à partir d'un milieu KCl et non saccharose car, avec ce dernier, le couplage des mitochondries est moins bon, nous choisissons donc la condition optimale. A 30°C, la concentration en oxygène dans le tampon KCl utilisé est de 440 nM d'oxygène par mL.

Les mesures oxygraphiques sont réalisées dans un volume final de 1,6 ml de tampon de respiration (KCl 125 mM, Tris-HCl 20 mM, EGTA 1 mM, pH 7,2) supplémenté avec de la BSA délipidée (0,15%). A ce tampon de respiration sont ajoutés du phosphate inorganique (Pi 10 mM pour le muscle, Pi 5 mM pour le foie), les mitochondries (0,2 mg/ml pour le muscle, 1mg/mL pour le foie) et des substrats respiratoires en concentrations saturantes :

- du glutamate / malate (5 mM / 2,5 mM), substrat fournisseur de NADH, H⁺ (figure 1)
- du succinate (5 mM), substrat fournisseur de FADH₂ lors de sa réduction en fumarate par la succinate déshydrogénase, + de la roténone (2,5 µM), inhibiteur du complexe I.
- du glutamate / malate (5 mM / 2,5 mM) + du succinate (5 mM).
- de la proline (5 mM), substrat protéique fournisseur de NADH, H⁺ et de FADH₂ (figure 2).
- du palmitoylcarnitine (55 µM), substrat lipidique à chaîne longue entrant par la palmitoylcarnitine transférase (CPT1), + du malate (1 mM).

- de l'octanoylcarnitine (110 μ M), substrat lipidique à chaîne moyenne ne faisant pas intervenir la CPT 1, + du malate (1 mM).

Les deux substrats lipidiques permettent d'avoir un index de l'oxydation des acides gras (β -oxydation).

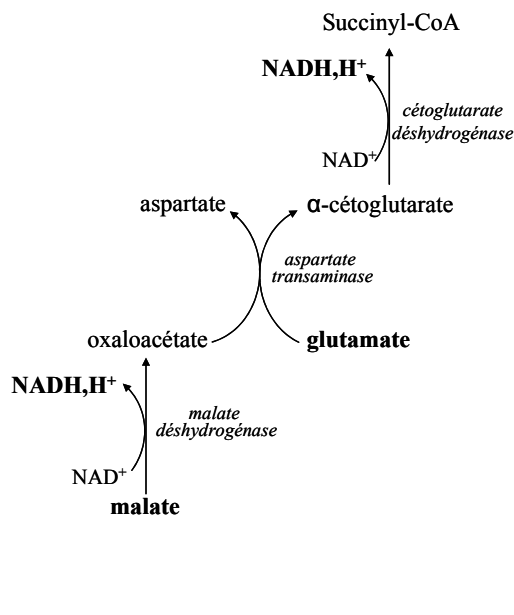


Figure 1 : Catabolisme du glutamate/malate
Schéma simplifié à intégrer dans la navette malate-aspartate.

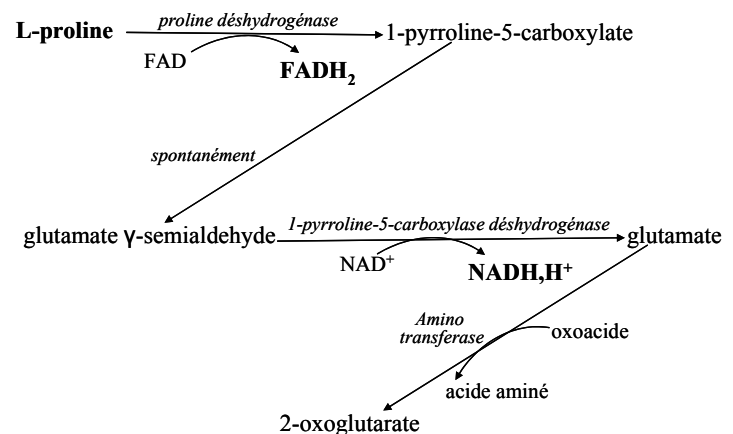


Figure 2 : Catabolisme de la proline

L'addition d'un substrat de la chaîne respiratoire à la préparation mitochondriale initie une consommation d'oxygène lente et contrôlée (figure 3). Cette respiration minimale nécessaire pour générer et maintenir le potentiel de membrane ($\Delta\psi$) est définie comme l'état 2. L'addition d'ADP (300 μ M pour le muscle, 1 mM pour le foie) provoque une accélération de l'utilisation de l'oxygène par les mitochondries. Cette respiration active, définie comme l'état 3, est liée à l'utilisation du gradient électrochimique de protons par l'ATP synthase. La respiration basale réelle, état 4, est obtenue après l'ajout d'oligomycine (40 mg/mL), un inhibiteur de l'ATP synthase ; ceci permet d'évaluer la contamination par les ATPases non mitochondriales. Le contrôle respiratoire (*RCR : respiratory control ratio*) est calculé en faisant le rapport état 3 sur état 4, ceci nous donne une idée du degré du couplage entre l'oxydation et la phosphorylation.

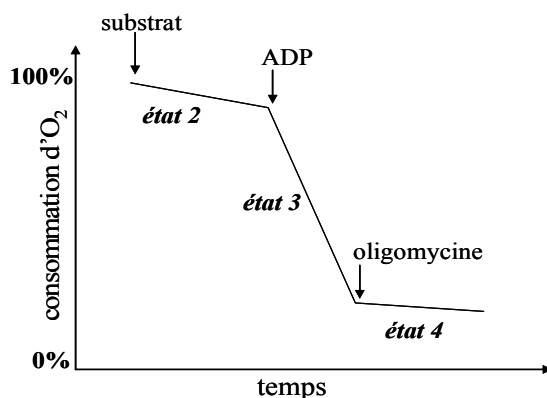


Figure 3 : Mesure de la respiration mitochondriale

L'activité de la cytochrome oxydase (complexe IV) est évaluée par l'addition de N,N,N',N' Tétraméthyl-1,4-PhénylèneDiamine (TMPD - 0,5 mM) en présence d'ascorbate (2,5 mM) et d'antimycine A (1,5 μ M). L'ascorbate cède ses électrons au TMPD qui va réduire le cytochrome c, substrat de la cytochrome oxydase. L'antimycine A est un inhibiteur du complexe III.

Un découplant, le 2,4-DiNitroPhénol (DNP - 75 μ M), est finalement ajoutée dans la cuve.

V. PRODUCTION MITOCHONDRIALE D'H₂O₂

V.1. MESURE AVEC LA SONDE ACIDE HOMOVANILLIQUE (ETUDE 1)

La mesure est basée sur le principe suivant : en présence de peroxydase du raifort (horseradish peroxidase, HRP), l'acide homovanillique (HVA) est oxydé par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) générant un dimère fluorescent ($\lambda_{\text{excitation}} = 312 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 420 \text{ nm}$).

Le signal fluorescent est plus nette et plus intense lorsque la mesure est effectuée dans un milieu saccharose plutôt que dans un milieu KCl (milieu de respiration mitochondriale). Ainsi, la production de ROS par les mitochondries isolées de muscle squelettique est déterminée dans 1,9 ml final de milieu (saccharose 250 mM, Tris-HCl 20 mM, EGTA 1 mM, pH 7,4) supplémenté en BSA délipidée (0,15%), de Pi (10 mM), d'HVA (100 μ M) et d'HRP (1,2 U/ml). A ce tampon sont additionnés les mitochondries de muscle (0,2 mg/mL)

et les substrats respiratoires (mêmes concentrations finales que celles pour la mesure de la respiration mitochondriale). De l'ADP (100 μ M), de la roténone (2,5 μ M) et de l'antimycine A (1 μ M) sont successivement ajoutés ; l'ADP afin d'être dans les conditions phosphorylantes, la roténone afin d'inhiber le complexe I, premier site de production de ROS et l'antimycine A afin d'inhiber le complexe III, second site de production de ROS.

V.2. MESURE AVEC LA SONDE AMPLEX RED REAGENT (ETUDE 2 ET 3)

En présence de peroxydase du raifort (horseradish peroxidase, HRP), l'Amplex Red est oxydé par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) générant un dimère fluorescent ($\lambda_{excitation} = 560$ nm, $\lambda_{émission} = 584$ nm). Cette méthode est plus précise que celle décrite précédemment car, contrairement à la sonde HVA, les longues d'ondes de l'Amplex Red n'interfèrent pas avec celles du NADH. De plus, avec la sonde Amplex Red, aucune différence n'est observée lorsque la mesure est effectuée dans un milieu KCl ou saccharose.

La production de ROS par les mitochondries isolées de muscle squelettique et de foie est donc mesurée dans 1,9 ml final du même tampon de respiration (KCl 125 mM, Tris-HCl 20 mM, EGTA 1 mM, pH 7,2) supplémenté en BSA délipidée (0,15%), de Pi (10 mM pour le muscle, 5 mM pour le foie), d'Amplex Red (1 μ M) et d'HRP (6 U/ml). A ce tampon sont additionnés les mitochondries (0,2 mg/mL pour le muscle, 0,25 mg/mL pour le foie) et les substrats respiratoires (mêmes concentrations finales que celles utilisées pour la mesure de la respiration mitochondriale). De l'ADP (300 μ M pour le muscle, 1 mM pour le foie), de la roténone (2,5 μ M) et de l'antimycine A (1,5 μ M) sont successivement ajoutés.

VI. POTENTIEL DE MEMBRANE MITOCHONDRIAL

La mesure du potentiel de membrane mitochondrial (étude 1) a été réalisée au laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire – UMR 5123 (Lyon).

La force protonmotrice (Δp) a deux composantes. L'une issue du gradient de pH dont la valeur est la traduction directe de l'inégale répartition des ions H^+ de part et d'autre de la

membrane interne. L'autre issue du gradient de potentiel $\Delta\psi$ qui est le potentiel de membrane définit par un déséquilibre de charges entre la matrice et l'espace intermembranaire. L'équation finale qui caractérise Δp est donc $\Delta p = \Delta\psi - z\Delta pH$.

Dans la pratique, on s'affranchit de la mesure de $-z\Delta pH$ en convertissant le gradient de pH en gradient électrique à l'aide d'un échangeur antiport K^+/H^+ . Ainsi, en ramenant le gradient de pH à 0, Δp se trouve inchangé mais s'exprime entièrement sous la forme de $\Delta\psi$. Cette condition est obtenue en ajoutant un ionophore, la nigericine, à la suspension mitochondriale.

Le potentiel de membrane ($\Delta\psi$) des mitochondries est déterminé en même temps que la consommation d'oxygène. La méthode quantitative utilisée pour évaluer $\Delta\psi$ repose sur la mesure de la concentration d'une sonde moléculaire chargée positivement, le cation triphénylméthyl phosphonium (TPMP⁺) dont la distribution de part et d'autre de la membrane interne dépend du potentiel électrique.

Les mitochondries (0,35 mg de protéine.mL⁻¹) sont incubées à 30°C dans le milieu de respiration contenant de la roténone 5 μ M, de l'oligomycine 1 μ g.mL⁻¹ et de la nigericine 65 ng.mL⁻¹. L'électrode est calibrée en ajoutant successive du TPMP⁺ jusqu'à une concentration de 2 μ M. L'ajout de succinate 4 mM entraîne l'activation de la chaîne respiratoire et de ce fait la création d'un potentiel électrique transmembranaire $\Delta\psi$. Les cations TPMP⁺ vont donc se répartir de part et d'autre de la membrane interne, selon le gradient de charge, ce qui se traduit au niveau de l'électrode par une diminution de la concentration de TPMP⁺ dans le milieu. L'addition séquentielle de malonate jusqu'à 3 mM (inhibiteur du complexe II) ralentit peu à peu l'activité de la chaîne respiratoire induisant une diminution du potentiel transmembranaire et donc le re-largage de TPMP⁺ dans le milieu. En fin de titration, l'addition d'un ionophore (FCCP 0,4 μ M) permet d'effondrer totalement le potentiel de membrane donc de re-larguer la totalité du TPMP⁺ matriciel à l'exception de la fraction liée aux mitochondries.

VII. CAPACITE DE RETENTION CALCIQUE

L'ouverture du PTP est très finement régulée. Le calcium matriciel apparaît comme étant son inducteur le plus puissant.

La capacité de rétention calcique représente la quantité de calcium nécessaire et suffisante pour provoquer l'ouverture du PTP. Du Ca^{2+} , à dose et à intervalle de temps régulier (figure 5), est ajouté à la suspension mitochondriale. L'ouverture du pore est suivie grâce à une sonde fluorescente, le Calcium Green ($\lambda_{\text{excitation}} = 506 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 536 \text{ nm}$). Cette sonde reste à l'extérieur de la mitochondrie, elle ne diffuse pas à travers la membrane, et sa fluorescence est accrue lorsqu'elle est liée au calcium. Le Calcium Green permet donc de visualiser l'entrée et le re-largage du Ca^{2+} .

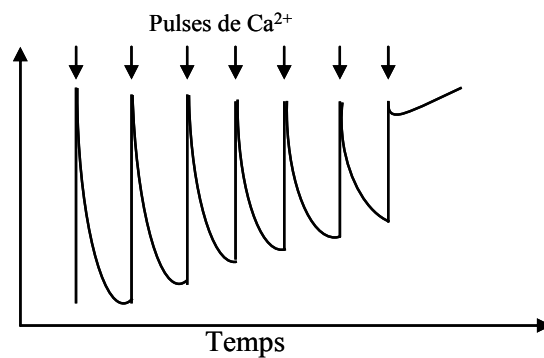


Figure 4 : Mesure de la capacité de rétention calcique

La capacité de rétention calcique des mitochondries isolées de muscle squelettique (étude 1) est déterminée dans 1,9 ml de tampon PTP (saccharose 250 mM, Pi-Tris 1mM, Tris-MOPS 10 mM). L'utilisation de ciclosporine A, inhibiteur de référence du PTP, permet de vérifier que l'augmentation brutale et irréversible du calcium extra-mitochondrial est bien la conséquence de l'ouverture du pore.

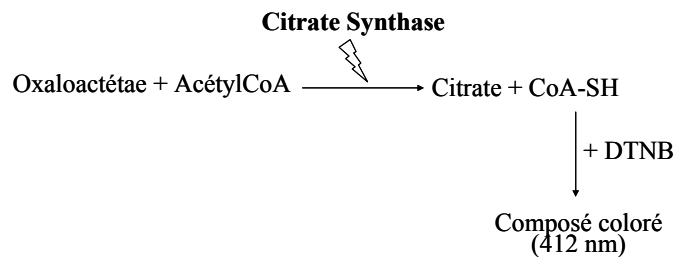
Les mitochondries isolées de muscle sont incubées à une concentration de 0,2 mg/ml dans le tampon en présence de 2,5 μM de Calcium Green pendant 2 min, puis des pulses de Ca^{2+} (13,16 μM) sont ajoutés toutes les minutes. La capacité de rétention calcique est exprimée en nmol de Ca^{2+} nécessaire à l'ouverture du pore par mg de protéines mitochondriales.

VIII. ACTIVITES ENZYMATIQUES SUR MITOCHONDRIES ISOLEES

Les mesures d'activités spécifiques de la citrate synthase (enzyme de la matrice), des complexes I, II et IV de la chaîne respiratoire sont réalisées par spectrophotométrie.

VIII.1. CITRATE SYNTHASE

La citrate synthase est une enzyme du cycle de l'acide citrique spécifique de la matrice mitochondriale. Son activité est un index de la densité mitochondriale.



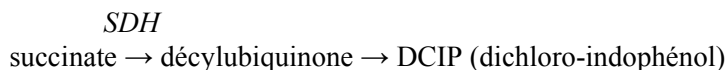
La mesure de son activité est basée sur la mesure de l'apparition du coenzyme A qui porte un groupement sulphydryl SH. Ce groupement réagit avec le 5-5'-DiThiobis(2-acide NitroBenzoïque) (DTNB 150 μM) apporté dans le milieu réactionnel (tampon Tris 150 mM, Triton 0,1%, acétyl coenzyme A 300 μM). La réaction est activée par l'ajout d'oxaloacétate (500 μM) et mesurée à 412 nm. 4 μg de protéines mitochondriales de muscle squelettique et 24 μg de protéines mitochondriales de foie sont nécessaires à ce dosage. Les résultats sont exprimés en $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines mitochondriales.

VIII.2. COMPLEXE I (NADH-UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE ROTENONE-SENSIBLE)

La mesure est effectuée dans un tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM (pH 7,5) supplémenté en BSA (3,5 mg/mL) avec comme accepteur le décylubiquinone (100 μM) et comme donneur le NADH (100 μM). L'oxydation du NADH est mesurée à 340nm, l'addition de roténone (10 μM) permet de déterminer l'activité sensible à la roténone qui est caractéristique du complexe

I. 2 μg de protéines mitochondriales de muscle squelettique et 12 μg de protéines mitochondriales de foie sont nécessaires à ce dosage. Les résultats sont exprimés en $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines mitochondriales ou en fonction du rapport : activité du complexe I sur activité de la citrate synthase (CI/CS).

VIII.3. COMPLEXE II (SUCCINATE-UBIQUINONE REDUCTASE)



L'activité de la succinate-ubiquinone oxydoreductase est déterminée en mesurant la réduction du 2,6-DiChlorophenolIndoPhénol (DCIP - 100 μM) à 600nm. Cette mesure est effectuée dans un tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM (pH 7,5) en présence de BSA (2,5 mg/mL), de succinate (30 mM), de decylubiquinone (50 μM), de roténone (5 μM) et d'antimycine A (9,3 μM). 8 μg de protéines mitochondriales de muscle squelettique et 24 μg de protéines mitochondriales de foie sont nécessaires à ce dosage. Les résultats sont exprimés en $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines mitochondriales ou en fonction du rapport : activité du complexe II sur activité de la citrate synthase (CII/CS).

VIII.4. COMPLEXE IV (CYTOCHROME C OXYDASE)

Le dosage est réalisé à 550nm en mesurant l'oxydation du cytochrome C (80 μM) dans un tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM (pH 7). D'après un consensus effectué par différents laboratoires, l'ajout ou non d'inhibiteurs du complexe III ne modifie en rien l'activité du complexe IV mesurée. 2 μg de protéines mitochondriales de muscle squelettique et 8 μg de protéines mitochondriales de foie sont nécessaires à ce dosage. Les résultats sont exprimés en $\text{nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines mitochondriales ou en fonction du rapport : activité du complexe IV sur activité de la citrate synthase (CIV/CS).

IX. CYTOCHROMES DE LA CHAÎNE RESPIRATOIRE

La détermination de la concentration en cytochromes de la chaîne respiratoire est réalisée par spectrophotométrie selon la méthode de Williams (1964). L'intensité du spectre d'absorption des cytochromes varie selon leur degré d'oxydoréduction. La suspension mitochondriale de foie (5 mg.ml^{-1}) est placée dans du tampon de respiration (KCl 125 mM, Tris-HCl 20 mM, EGTA 1 mM, pH 7,2) et répartie dans deux cuves maintenues à 37°C (étude 3). Dans une cuve échantillon, les cytochromes sont entièrement réduits par l'ajout d'ascorbate (50 mM) et de quelques cristaux de dithionite de sodium. Dans l'autre cuve, les cytochromes sont totalement oxydés par l'ajout de ferricyanure (50 mM).

La différence de DO entre les deux spectres réduits et oxydés à des longueurs d'ondes précises permet de calculer la concentration en cytochromes des mitochondries. Ainsi les contenus en cytochrome a+a₃, b, c et c₁ sont déterminés selon les calculs définis dans l'article de Williams (1964).

X. PARAMETRES DU STRESS OXYDANT

X.1. PREPARATION DES HOMOGENATS

Un rapport de 100 mg de tissu (foie) dans 1mL du milieu d'homogénéisation (Triz-Base 10 mM, Acide Diéthylène TriaminePenta (DTPA) 1 mM, acide PhenylMethylSulFonyl (PMSF) 1 mM) est broyé à l'aide d'un potter en verre. Les broyats sont centrifugés à 3290 g pendant 10 min à 4°C. Les surnageants (*S-broyat*) ainsi obtenus sont récupérés afin de suivre différents protocoles décrits ci-dessous.

Les mesures de la peroxydation lipidique, de l'oxydation des protéines et des activités des enzymes antioxydantes (SOD, GPx, catalase) ont été réalisées au laboratoire de Nutrition, Vieillesse et Maladies Cardiaques (Grenoble).

X.2. PEROXYDATION LIPIDIQUE (MESURE DES TBARS)

La mesure des TBARS (Thiols Barbituric Acid Reactive Species) est effectuée selon la méthode de Richard *et al* (1992).

La calibration est obtenue à partir d'une solution de 1,1,3,3-TétraEthoxyPropane (TEP) allant de 1 à 8 μM . La calibration et les échantillons (*S-broyat*) sont mis en présence d'un mélange d'acide thiobarbiturique (TBA) et d'acide perchlorique (HClO_4) 7% puis placés pendant 1h dans un bain-marie à 95°C. Les fonctions aldéhydiques du dialdéhyde malonique (MDA), libérées par l'hydrolyse acide à 95°C, réagissent avec le TBA pour donner un complexe de couleur rose ($\text{MDA}(\text{TBA})_2$). Pour arrêter la réaction, les tubes sont placés dans la glace. Après extraction du système coloré MDA/TBA avec du 1-butanol, la fluorescence est mesurée par fluorimétrie à $\lambda_{\text{excitation}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 553 \text{ nm}$.

X.3. OXYDATION DES PROTEINES (MESURE DES THIOLS)

Les Thiols sont dosées selon la méthode de Faure & Lafond (1995).

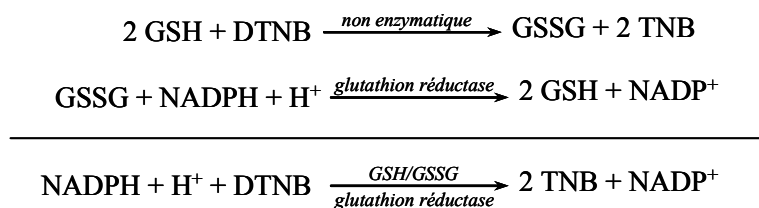
Le principe du dosage de l'oxydation des protéines est basé sur la mesure des groupements SH réagissants avec le 5-5'-DiThiobis(2-acide NitroBenzoïque) (DTNB) pour former un composé coloré ($\lambda = 415 \text{ nm}$).

La calibration est obtenue avec deux solutions de N-Acetyl Cystéine (NAC) 0,125 à 0,6 mmol. La calibration et les échantillons (*S-broyat*) sont mesurés à 415 nm en présence de tampon phosphate 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8 et de DTNB 2,5 mM.

X.4. GLUTATHION

600 μL de surnageant (*S-broyat*) sont ajoutés à 120 μL d'Acide MétaPhosphorique (MPA) (rapport 5/1) et laissés précipiter dans la glace avant d'être centrifugés à 1700 g pendant 10 min à 4°C. Les homogénats déprotéinisés sont neutralisés par une solution contenant du MOPS 0,4 M et de l'EDTA 2 mM, pH 6,75 puis dosés par la méthode d'Akerboom & Sies (1981).

A partir des réactions suivantes :



Le principe du dosage du glutathion est basé sur la réduction du 5-5'-DiThiobis(2-acide NitroBenzoïque) (DTNB) par le NADPH. La formation de 5-Thio-2-NitroBenzoate (TNB) est suivie par spectrophotométrie à 412 nm. La sensibilité du dosage peut être augmentée en mesurant la disparition du NADPH par fluorimétrie.

X.5. SUPEROXYDE DISMUTASE (SOD)

Les surnageants (*S-broyat*) subissent 3 cycles de congélation (1 min à l'azote liquide) – décongélation (3 min bain-marie à 37°C) avant d'être centrifugés à 15550 g pendant 25min à 4°C. Le surnageant est alors récupéré.

Le dosage de la SOD est effectué selon la méthode de Marklund & Marklund (1974).

L'autooxydation du pyrogallol en présence d'EDTA est inhibée par la SOD. De pH 7.9 à 9.1, la réaction est inhibée jusqu'à 90% par la SOD, ce qui indique une totale dépendance de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) dans cette autooxydation.

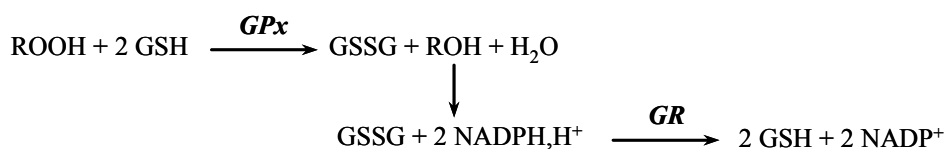
Le principe du dosage est donc basé sur la compétition entre la réaction d'oxydation du pyrogallol (10 mM) par l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ et la dismutation de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ par la SOD.

Une unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme capable d'inhiber 50% de l'oxydation du pyrogallol dans les conditions du dosage.

X.6. GLUTATHION PEROXYDASE (GPx)

Le dosage de la GPx est effectué selon la méthode de Gunzler *et al* (1974).

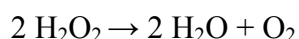
A partir des réactions suivantes :



Le principe de dosage de la GPx est basé sur une réaction couplée entre la GPx et la glutathion réductase (GR). La détermination de l'activité de la GPx repose ainsi sur la mesure de la disparition du NADPH, H⁺ suivie par spectrophotométrie à 340 nm, avec comme substrat réactionnel le t-butyl hydroperoxyde.

X.7. CATALASE

Le surnageant est centrifugé à 15500 g pendant 25 min à 4°C. Le surnageant ainsi récupéré est utilisé pour le dosage qui est réalisé dans une tampon Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7. Le dosage spectrophotométrique est basé sur la disparition de l'H₂O₂ à 240 nm.



C'est une réaction du premier ordre. La quantité d'H₂O₂ décomposé est directement proportionnelle à la concentration en substrat et la concentration en enzyme.

XI. CONCENTRATION D'ARN D'UCP2 ET UCP3 DANS LE MUSCLE

Les mesures de concentration en ARN UCP2 et UCP3 (étude 1) ont été réalisées au laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire – UMR 5123 (Lyon).

Les ARN totaux sont extraits à partir des échantillons de quadriceps (80 mg) mis dans du Tri Reagent[®] (Euromedex). Les concentrations et les puretés sont vérifiées en mesurant de la densité optimale à 260 et 280 nm. Leurs intégrités sont contrôlées par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Les concentrations des ARNm UCP2 et UCP3 sont mesurées par RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction) en utilisant la β-actine comme référence. Les séquences des amorces sont décrites dans le tableau 6. La transcription inverse des ARNm en ADN complémentaire (ADNc) est réalisée à partir de 0,1 µg d'ARN totaux avec 100 U de M-MLV Reverse Transcriptase (Progema), 5 µL de tampon M-MLV RT 5X, 20 U d'un inhibiteur des ribonucléases (RNasin, Progema), 12 pmol de triphosphate désoxynucléoside et 15 pmol d'amorces antisens spécifiques, dans un volume final de 25 µL. La réaction se décompose en 3 étapes : une étape de 5 min à 70°C (avec les ARN et les

amorces antisens) suivie d'une étape de 60 min à 42°C (avec tout le mélange) et d'une étape de 15 min à 70°C. Après refroidissement, 5 µL sont utilisés pour la PCR. 5 µL du tampon RT sont ajoutés au 45 µL de mélange PCR (5 µL de tampon 10X REDTaq PCR) contenant 6 pmol de MgCl₂, 8 pmol de triphosphate désoxynucléoside, 2,5 U de REDTad DNA Polymerase (Sigma), 15 pmol d'amorces antisens correspondant et 22,5 pmol d'amorces sens. Après une dénaturation initiale de 2 min à 94°C, un nombre variables de cycles de PCR (1 cycle = 1 min à 94°C pour la dénaturation, 1 min à 60 °C pour l'hybridation et 1 min à 72°C pour l'élongation) est effectué : 28 cycles pour l'UCP3, 35 cycles pour l'UCP2 et 18 cycles pour la β-actine. La PCR est stoppée par 10min à 72°C. Les produits de la PCR sont séparés sur de gel d'agarose 2% contenant du bromure d'éthidium. La quantification de l'intensité relative des bandes est déterminé à l'aide d'un système d'analyse d'image Kodak Digital Science 1D 2.0 (Kodak Scientific Imaging System).

Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées pour la RT-PCR

	Sens (5' 3') →	Antisens (5' 3') →	Taille (bp)
β-actine (gi11420427)	<i>GAC GAG GCC CAG AGC AAG AGA</i>	<i>GGG TGT TGA AGG TCT CAA ACA</i>	225
UCP2 (gi9507230)	<i>ACA AGA CCA TTG CAC GAG AG</i>	<i>CAT GGT AAG GGC ACA GTG AC</i>	295
UCP3 (gi48675842)	<i>ATG CAT GCC TAC AGA ACC AT</i>	<i>CTG GGC CAC CAT CCT CAG CA</i>	314

XII. COMPOSITION EN LIPIDES ET EN ACIDES GRAS DES MEMBRANES MITOCHONDRIALES

Les mesures de la composition en lipides et en acides gras des membranes mitochondriales de foie (étude 3) ont été réalisées à l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides – UMR 1154 (Paris).

Les phospholipides et des lipides neutres sont extraits selon la méthode de Bligh & Dyer (1959). L'analyse des phospholipides et des acides gras de membranes mitochondriales est effectuée par HPLC.

XII.1. COMPOSITION EN PHOSPHOLIPIDES

La colonne de chromatographie utilisée est une colonne PVA-Sil (YMC) de longueur 150 mm, de diamètre interne 2,1 mm avec un diamètre de particules de 129Å. La colonne est à 35°C et le débit des solvants est de 0,4 mL.min⁻¹. Les trois solvants (A, B et C) contiennent 1% d'acide acétique et 0,08% de triéthylamine :

- solvant A : heptane / isopropanol (98/2)
- solvant B : chloroforme / isopropanol (65/35)
- solvant C : méthanol / H₂O (95/5)

Le détecteur à diffusion de lumière est réglé avec une pression de 1 bar, une atténuation de 400, une température de nébulisation de 35°C et une température d'évaporation de 45°C.

Le volume d'injection est de 25 µL. La chaîne UPLC est un système AGILENT 1100.

XII.2. COMPOSITION EN ACIDES GRAS

L'analyse des acides gras s'effectue par chromatographie en phase gazeuse utilisant un détecteur FID (Varian 3900). Toutes les classes d'acides gras sont identifiés et comparés à des standards. Les échantillons extraits par la méthode de Bligh & Dyer sont saponifiés puis méthylés avec ajout d'un standard interne (C17 :0). Les acides gras obtenus correspondent à 98% environs des phospholipides constituant la membrane des mitochondries.

La colonne utilisée est une colonne EC-WAX (Alltech) de longueur 30 m, de diamètre interne 320 µm et d'épaisseur de film 0,25 µm. La température de l'injecteur est de 220°C, le détecteur est de 250°C. La programmation en température est la suivante : le four est à 60°C puis une augmentation de 7,5°C.min⁻¹ jusqu'à 220°C avec un plateau pendant 50 min. Le débit du gaz vecteur (hydrogène) est de 1,5 mL.min⁻¹. L'injection se fait en split avec une fuite de 1/20. Le volume d'injection est 1 µL dans l'hexane. L'analyse dure 60 min.

XIII. STATISTIQUES

Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ sem (écart standard à la moyenne) avec $n \approx 10$ pour chaque groupe. L'analyse de variance (ANOVA) sur mesures non-répétées ou répétées permet d'établir les comparaisons statistiques avec un seuil de significativité de 5%. Pour l'étude 2, une analyse ANOVA 2 voies est effectuée suivi d'un test *post hoc* de Fisher (si $p < 0,05$).

Tous les tests statistiques sont réalisés en utilisant le logiciel Statview.

RESULTATS & DISCUSSION

ETUDE I

La consommation de lipides supprime les effets bénéfiques de la restriction calorique sur la production d'H₂O₂ mitochondriale de muscles squelettiques

Fat intake reverses the beneficial effects of low caloric intake on skeletal muscle mitochondrial H₂O₂ production

Blandine GARAIT, Karine COUTURIER, Stéphane SERVAIS, Dominique LETEXIER, David PERRIN, Cécile BATANDIER, Jean-Louis ROUANET, Brigitte SIBILLE, Benjamin REY, Xavier LEVERVE et Roland FAVIER.

Free Radical Biology and Medicine 39 (2005) 1249 - 1261

Si la restriction calorique est connue pour diminuer le stress oxydant (*Sohal & Weindruch, 1996 ; Merry, 2002 ; Yu, 1996*), celui-ci est augmenté par le régime riche en lipides (*Brownlee & Cerami, 1981 ; Evans et al, 2002 ; Paolisso et al, 1996 ; Slim et al, 1996*). Cependant, les résultats de Kritchevsky (*1993*) suggèrent que le stress oxydant lié à la forte consommation de lipides peut être modulé en ajustant les apports caloriques. Il nous paraît donc intéressant de déterminer la production de ROS chez des rats Lou/C et de les soumettre à un régime riche en lipides. En effet, cette souche de rat est caractérisée par une prise alimentaire spontanément réduite et montre une préférence pour les lipides au détriment des glucides sans pour autant développer une obésité (*Alliot et al, 2002 ; Couturier et al, 2002 ; Helies et al, 2005 ; Kappeler et al, 2004 ; Veyrat-Duberey & Alliot, 1997*).

Trois groupes sont alors constitués : 1°) un groupe de rats Lou/C soumis à un régime standard riche en glucides (high carbohydrate, HC), 2°) un groupe de rats Wistars soumis à ce même régime, souche dont sont issus les rats Lou/C et 3°) un groupe de rats Lou/C ayant la possibilité d'augmenter leur consommation de lipides (high fat, HF). Nous nous proposons de mesurer la production de ROS dans les mitochondries de muscle squelettique de ces rats mais également la régulation du pore de transition de perméabilité (PTP). D'une part, les ROS activent l'ouverture de ce pore (*Chen et al, 2003b ; Skulachev, 1996*). D'autre part, le PTP est impliqué dans le contrôle de l'apoptose (*Kroemer et al, 1997*) qui intervient dans le processus de vieillissement (*Pollack et al, 2002*). Le ralentissement du vieillissement observé chez les

rats Lou/C (*Alliot et al, 2002*) pourrait donc être la conséquence d'une production radicalaire amoindrie.

RESULTATS

Courbe de croissance et prise alimentaire

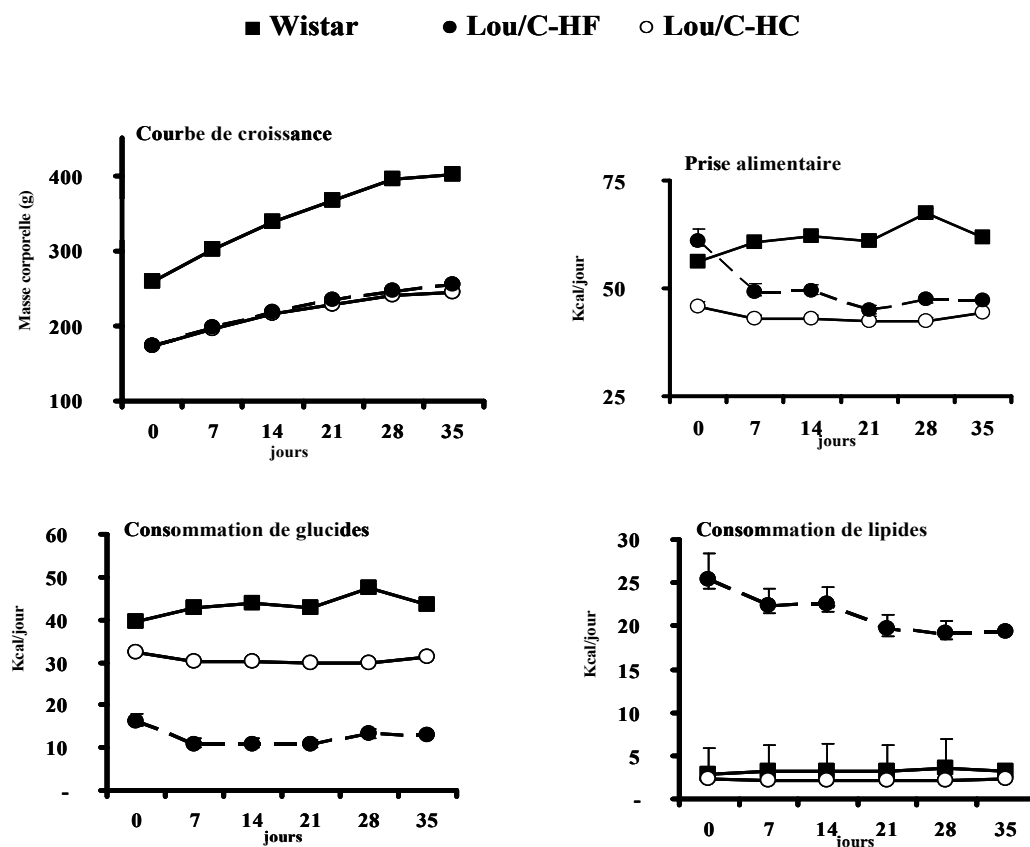


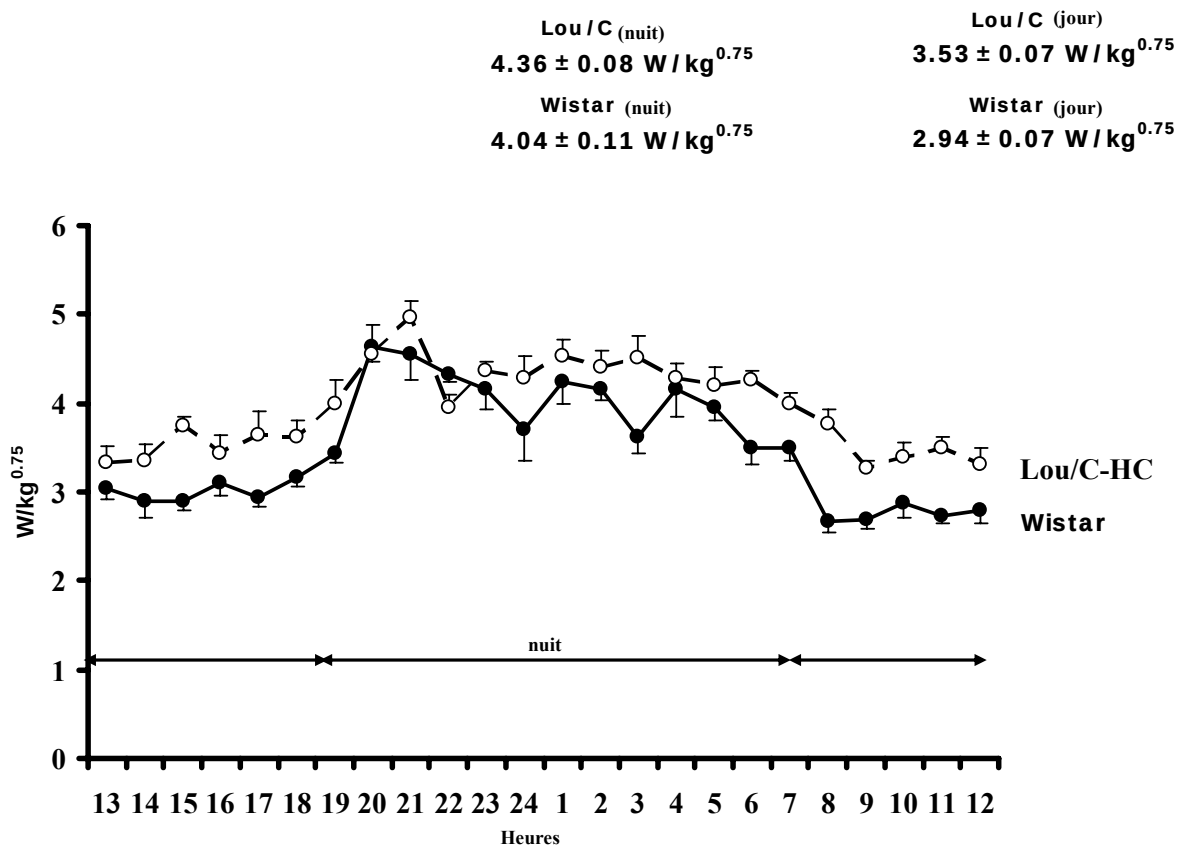
Figure 1 : Courbe de croissance et prise alimentaire de rats Wistar et Lou/C soumis à un régime riche en glucides (HC) ou en lipides (HF).

La courbe de croissance des rats Lou/C soumis au régime standard (high carbohydrate, HC) est ralentie du fait d'une prise calorique spontanément réduite (figure 1). Cette réduction est 35-40% inférieure à celle enregistrée avec les rats Wistar (avec une consommation totale sur les 8 semaines de régime de 2355 ± 88 kcal pour les Lou/C-HC et de 3763 ± 53 kcal pour les Wistar). La prise alimentaire totale des rats Lou/C soumis au régime riche en lipides (high

fat, HF) est de 2317 ± 63 kcal, valeur proche de celle des Lou/C-HC. Cependant, durant la toute première semaine de régime, les rats Lou/C ont une prise alimentaire semblable à celle des rats Wistar, qu'ils aient accès au régime HC ou HF. Les rats Lou/C-HF montrent une nette préférence pour les lipides pouvant représenter jusqu'à 40% de leur prise calorique totale. Cette augmentation est compensée par une diminution de la consommation de glucides qui passe de 60% à 15% des apports caloriques totaux.

Dépense énergétique, activité locomotrice, statut thyroïdien

A



B

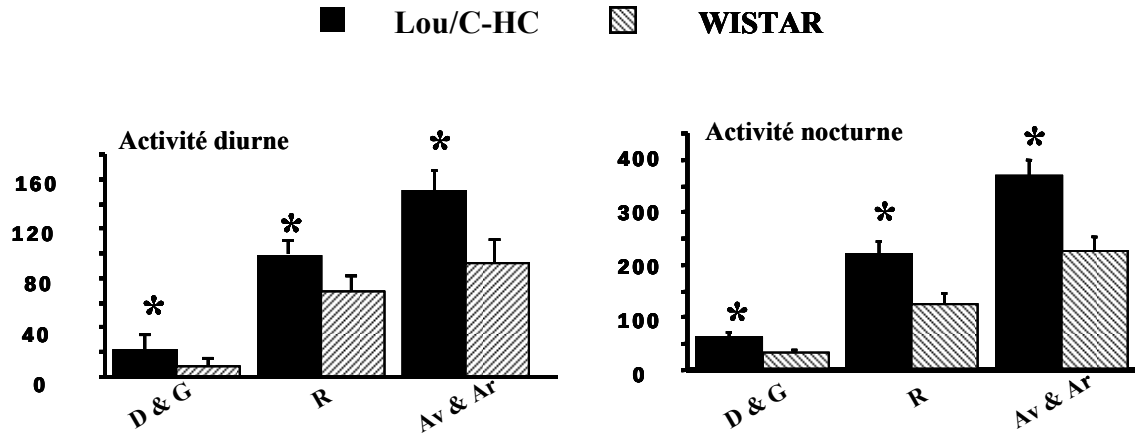


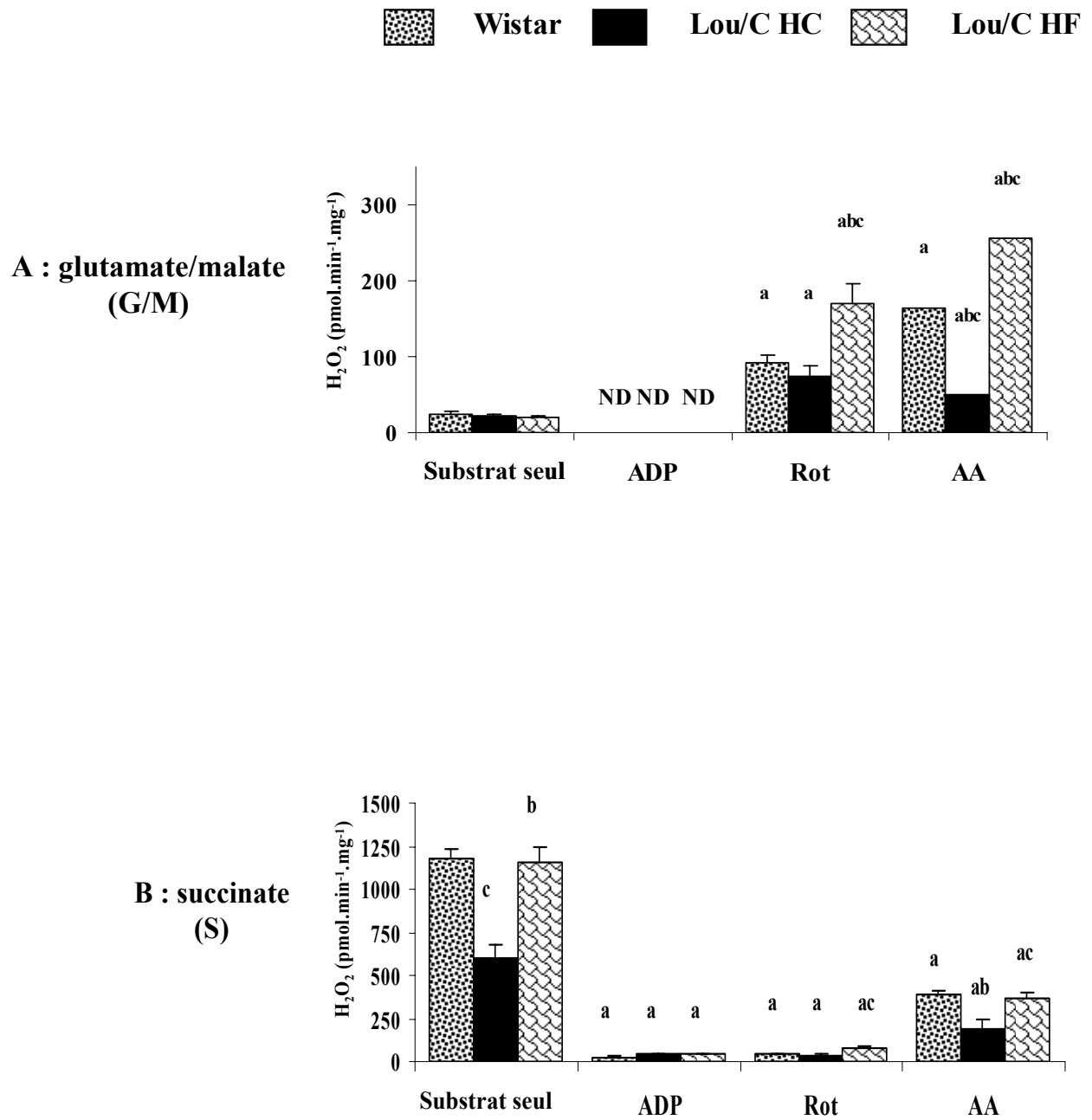
Figure 2 : Dépense énergétique totale (mesurée par calorimétrie indirect, en Watt/kg^{0,75}) et activité locomotrice (actimètre) des rats Lou/C et Wistar. (A) La dépense énergétique est exprimée en consommation d'O₂ ajustée à la masse (par kg^{0,75}). (B) L'activité locomotrice est exprimée en mouvements horizontaux (Avant et Arrière [Av & Ar], Droite et Gauche [D & G]) et verticaux (Redressement [R]) des animaux pendant la phase diurne et nocturne.

* : significativement différent du Wistar

La consommation d'O₂ est significativement plus élevée chez les rats Lou/C ($3,95 \pm 0,10$ W/H/kg^{0,75}) que chez les rats Wistar ($3,49 \pm 0,13$ W/H/kg^{0,75}). La différence de dépense énergétique entre les deux souches est plus prononcée pendant la phase diurne ($\approx 16\%$) que pendant la phase nocturne ($\approx 8\%$). De plus, les rats Lou/C montrent une plus grande activité locomotrice durant les deux périodes de jour et de nuit (figure 2B).

La dépense énergétique étant dépendante du statut thyroïdien, les concentrations circulantes de la triiodothyronine (T3) et de la thyroxine (T4) chez les rats Lou/C et Wistar ont été mesurées. Mais aucune différence n'a été trouvée entre les 2 souches, ni la T3 ($4,8 \pm 0,8$ et $5,3 \pm 0,3$ pg.mL⁻¹), ni la T4 ($17,3 \pm 1,7$ et $20,6 \pm 1,0$ pg.mL⁻¹).

Production d'H₂O₂ mitochondriale



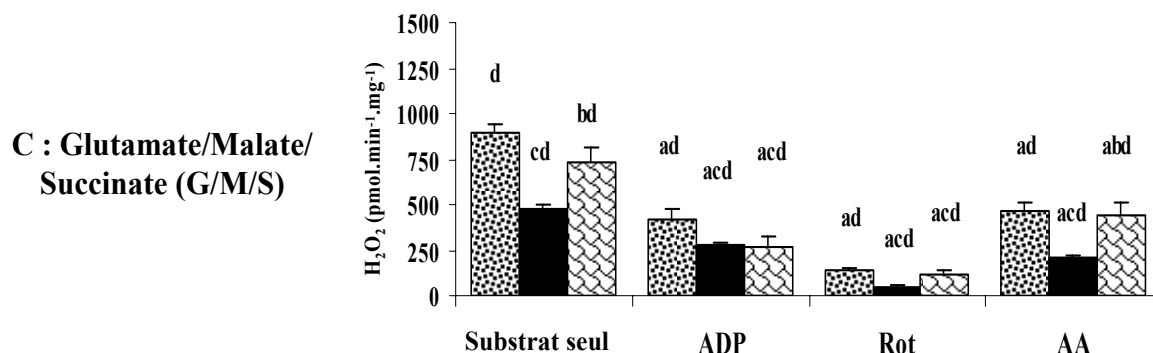


Figure 3 : Production d' H_2O_2 par les mitochondries de muscle squelettique de rats Wistar et Lou/C soumis à un régime riche en glucides (HC) ou riche en lipides (HF). Production d' d' H_2O_2 en présence de différents substrats respiratoires : A. glutamate/malate, B. succinate, C. glutamate/malate + succinate.

Rot : roténone, AA : antimycine A.

^a : significativement différent du substrat seul

^b : significativement différent du Lou/C-HC

^c : significativement différent du Wistar

^d : significativement différent du succinate.

A l'état 4 et en présence de glutamate/malate, la production d' H_2O_2 par les mitochondries de Lou/C-HC est la même que celle des Wistar (figure 3A). En revanche, lorsque les mitochondries respirent avec du succinate seul (figure 3B) ou combiné avec du glutamate/malate (figure 3C), la production de ROS chez les Lou/C-HC est diminuée de moitié. Cette faible production d' H_2O_2 par les mitochondries de rats Lou/C-HC est due à une diminution de la génération d' H_2O_2 au niveau du complexe I (à travers le flux reverse d'électrons) et du complexe III. Ceci s'explique 1°) par la très faible production d' H_2O_2 après l'addition de roténone (inhibiteur spécifique du complexe I) lorsque les mitochondries sont incubées avec du succinate, et 2°) par la faible production d' H_2O_2 après l'addition d'antimycine A (inhibiteur spécifique du complexe III) lorsque les mitochondries sont incubées avec du glutamate/malate.

La diminution de la production mitochondriale de ROS observée chez les Lou/C-HC est totalement abolie lorsque ces rats sont soumis au régime riche en lipides, et ce pour tous les substrats respiratoires (glutamate/malate et/ou succinate). La quantité d' H_2O_2 produite chez les Lou/C-HF est alors semblable à celle mesurée chez les rats Wistar soumis au régime HC.

Consommation d'oxygène mitochondriale (tableau 1)

		Wistar	Lou/C-HC	Lou/C-HF
GLUT/MAL	<i>Etat 4</i>	17.3 ± 1.2	16.7 ± 1.6	16.5 ± 1.7
	<i>Etat 3</i>	333 ± 19	293 ± 13*	386 ± 26†
	<i>RCR</i>	20.2 ± 1.7	19.4 ± 1.8	24.2 ± 1.8
SUCCINATE + ROT	<i>Etat 4</i>	45.3 ± 1.3 [#]	46.7 ± 2.7 [#]	51.8 ± 3.3 [#]
	<i>Etat 3</i>	321 ± 13	295 ± 12	302 ± 36
	<i>RCR</i>	7.1 ± 0.2 [#]	6.4 ± 0.3 [#]	5.8 ± 0.6 [#]
GLUT/MAL+ SUCC	<i>Etat 4</i>	49.0 ± 1.8 [#]	47.9 ± 1.8 [#]	55.7 ± 4.5 [#]
	<i>Etat 3</i>	410 ± 17 [#] £	401 ± 21 [#] £	447 ± 22£
	<i>RCR</i>	8.5 ± 0.4 [#] £	8.4 ± 0.4 [#] £	8.3 ± 0.7 [#] £

Tableau 1 : Consommation d'oxygène (natome d'O.min⁻¹.mg⁻¹) de mitochondries de muscle squelettique de rats Wistar et Lou/C soumis à un régime riche en glucides (HC) ou riche en lipides (HF).

: significativement différent du glutamate/malate dans un même groupe de rat

£ : significativement différent du succinate dans un même groupe de rat

* : significativement différente des rats Wistar

† : significativement différent du rat Lou/C-HC

Seule une différence est observée entre les rats Wistar et les rats Lou/C soumis au régime HC ou HF lorsque les mitochondries sont incubées avec du glutamate/malate en condition phosphorylante (état 3). Cette consommation d'oxygène, qui est inhibée chez les rats Lou/C-HC comparativement à celle des rats Wistar, est entièrement restaurée en soumettant ces rats au régime HF.

Conductance de la membrane mitochondriale et expression d'UCP3.

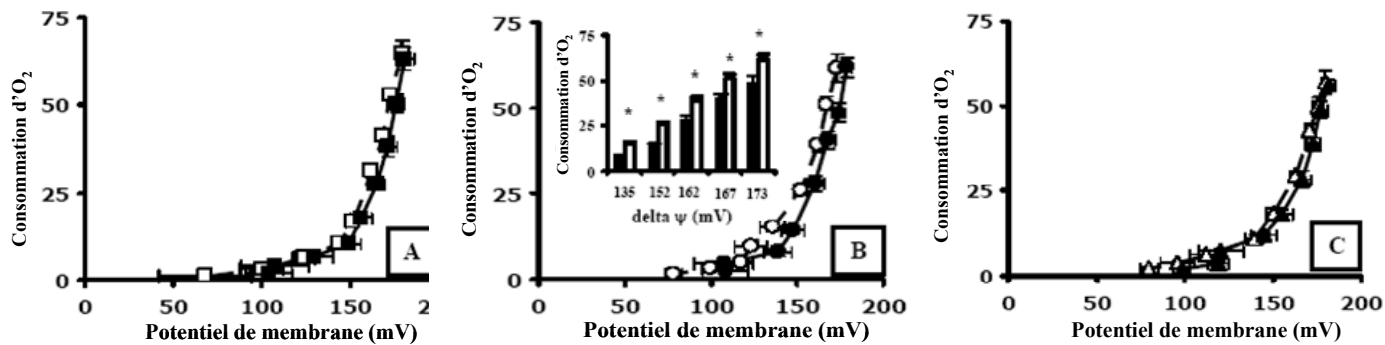


Figure 4 : Effect du palmitate sur la conductance de proton des mitochondries de muscle squelette de rats Wistar (rond noir) et Lou/C (rond blanc). A : condition contrôle, B : activation par l'addition de palmitate, C : prévention de l'activation par le GDP.

* : significativement différent du rat Wistar au même $\Delta\psi$ (insert dans B)

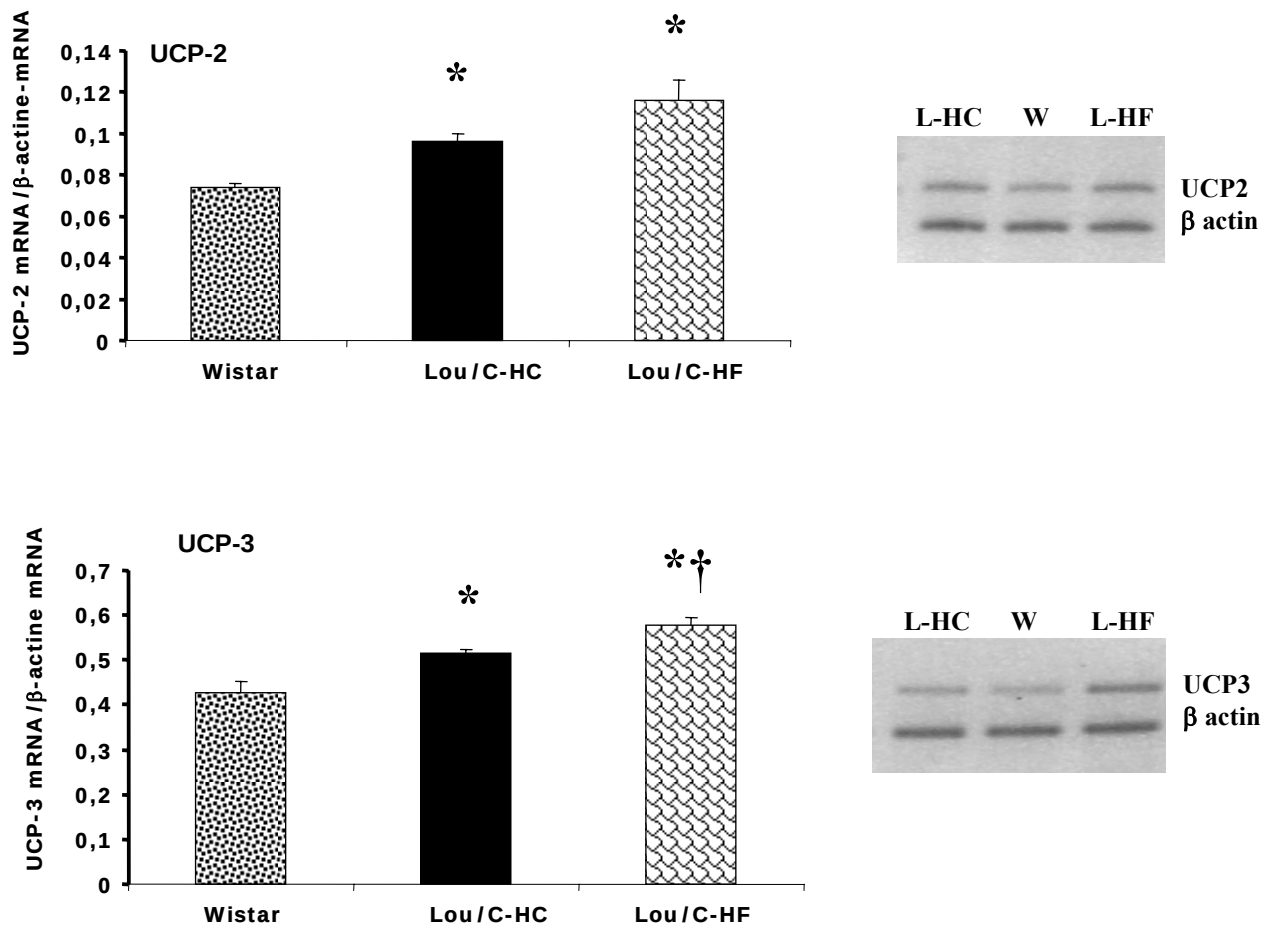


Figure 5 : Expression des ARNm d'UCP2 et UCP3 déterminé par RT-PCR de rats Wistar et Lou/C soumis à un régime riche en glucides (HC) ou riche en lipides (HF).

* : significativement différent du rat Wistar

† : significativement différent du rat Lou/C-HC

En condition contrôle (sans palmitate), les mitochondries du muscle squelettique montrent une réponse non linéaire caractéristique d'une fuite de protons dépendante du potentiel de membrane (figure 4). La conductance de protons est similaire chez les rats Lou/C-HC et les rats Wistar. Toutefois, en présence d'un activateur de l'UCP3 (palmitate), les rats Lou/C ont un niveau de respiration plus élevé aux potentiels de membranes compris entre 137 et 173 mV. Cette augmentation de la conductance de protons est prévenue par l'addition de GDP, prouvant qu'elle est dépendante de l'activation d'UCP3 par le palmitate. L'expression des ARNm d'UCP2 et UCP3 est significativement plus importante chez les rats Lou/C-HC (figure 5). Le régime riche en lipides augmente l'expression d'UCP3 alors que la quantité d'UCP2 reste similaire entre les Lou/C-HF et les Lou/C-HC.

Activités enzymatiques de la chaîne respiratoire

	Wistar	Lou/C-HC	Lou/C-HF
Complex I (nmol/min/mg protéine)	243 ± 18	189 ± 9*	235 ± 11†
Complex II (nmol/min/mg protéine)	150 ± 13	120 ± 11*	145 ± 27
Complex IV (nmol/min/mg protéine)	1481 ± 18	1541 ± 89	1762 ± 130
Citrate synthase activity (nmol/min/mg protéine)	1598 ± 88	1715 ± 107	2215 ± 116*†

Tableau 2 : Activités des enzymes de la chaîne respiratoire de mitochondries de muscle squelettique de rats Wistar et Lou/C soumis à un régime riche en glucides (HC) ou riche en lipides (HF).

* : significativement différent du rat Wistar

† : significativement différent du rat Lou/C-HC

L'activité enzymatique de trois complexes de la chaîne respiratoire est mesurée *in vitro* (tableau 2). Les activités des complexes I (NADH ubiquinone réductase) et II (succinate deshydrogénase) sont significativement diminuées chez les Lou/C-HC. Par contre, le complexe IV (cytochrome oxydase) ainsi que la citrate synthase (enzyme matricielle) ne sont pas affectés chez ces rats.

L'activité de la NADH ubiquinone réductase est entièrement restaurée lorsque les rats Lou/C sont soumis au régime HF. Ceci s'accompagne d'une augmentation significative de l'activité de la citrate synthase.

Ouverture du pore de transition de perméabilité induite par le Ca^{2+}

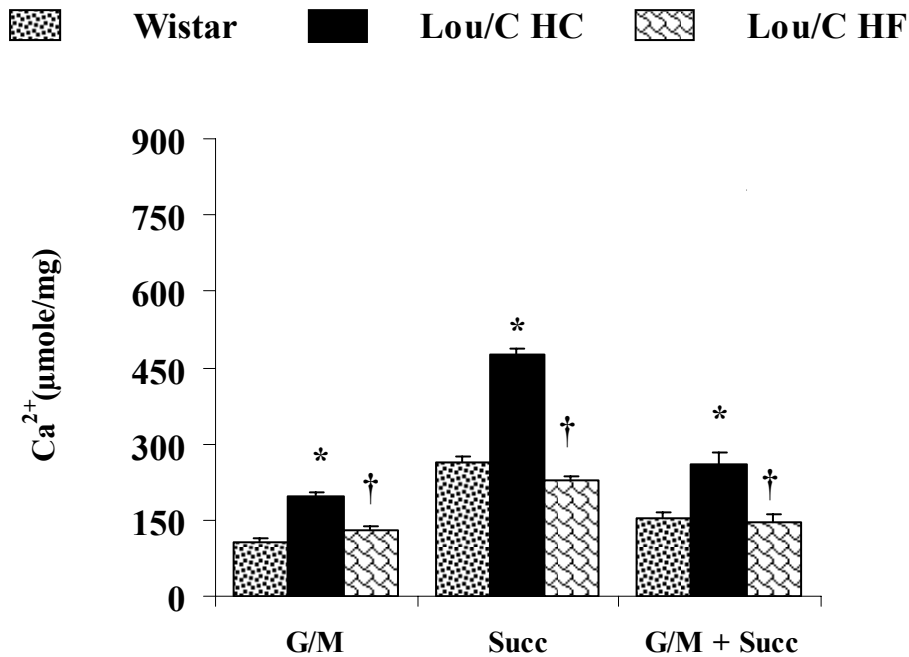


Figure 6 : Capacité de rétention calcique des mitochondries de muscle squelettique de rats Wistar et Lou/C soumis à un régime riche en glucides (HC) ou riche en lipides (HF).

* : significativement différent du rat Wistar

† : significativement différent du rat Lou/C-HC

La capacité de rétention calcique (CRC) des mitochondries de muscle squelettique est déterminée à partir de différents substrats respiratoires (figure 6). Chez les rats Wistar, les mitochondries incubées en présence de succinate + roténone ont une CRC 2 à 3 fois plus élevée que celle de mitochondries incubées avec de glutamate/malate. Lorsque les mitochondries sont alimentées simultanément avec du glutamate/malate et du succinate, la CRC augmente significativement de 50% par rapport à celle mesurée en glutamate/malate seul.

La CRC est significativement plus élevée chez les Lou/C-HC, et ce pour tous les substrats respiratoires (glutamate/malate et/ou succinate). Les rats Lou/C soumis au régime HF ont une CRC qui n'est pas différente de celle des rats Wistar soumis au régime HC.

DISCUSSION

Prise alimentaire et production de ROS par les mitochondries de muscle squelettique

Si la quantité d' H_2O_2 produite par les mitochondries de muscle squelettique est diminuée chez les rats Lou/C comparativement à celle des rats Wistar (figure 3), elle est toutefois augmentée dans le foie (*Lacraz et al, non publié*). Ceci confirme que la production de ROS dépend du tissu étudié (*Barja, 1999 ; Bevilacqua et al, 2004 ; Gredilla et al, 2001a*).

Cette faible quantité d' H_2O_2 produite dans le muscle squelettique des Lou/C-HC peut être due à divers mécanismes. Le premier serait dicté par la capacité des mitochondries de rats Lou/C à maintenir un faible degré de réduction des complexes I et III à l'état basal. Cependant, l'ajout de roténone et d'antimycine A, qui augmente fortement le degré de réduction des complexes I et III, ne supprime pas la différence de production de ROS entre les deux souches quand les mitochondries sont incubées avec du glutamate/malate (G/M) (figure 3). Le deuxième mécanisme à l'origine de cette faible production de ROS impliquerait une inhibition du complexe I (*Barja, 1999*). Cette hypothèse semble être vérifiée d'une part, par la plus faible consommation d'oxygène sous G/M à l'état 3 chez les rats Lou/C-HC par rapport à celle des rats Wistar (tableau 1), et d'autre part, par une diminution effective de l'activité de la NADH ubiquinone réductase sur mitochondries isolées (tableau 2).

Certaines études suggèrent que la réduction de la production de ROS observée lors d'une restriction calorique peut également s'expliquer par une faible dépense énergétique (*Pearl, 1928 ; Sohal & Weindruch, 1996*). Cette dernière est principalement régit par une faible fuite de protons au niveau des mitochondries (*Ramsey et al, 2000*) s'accompagnant d'une diminution de la consommation d'oxygène. Ainsi, en diminuant le flux d'électrons, la probabilité qu'un électron libre rencontre une molécule d'oxygène est réduite (*Ramsey et al, 2000 ; Bevilacqua et al, 2004*). Dans notre étude, les rats Lou/C-HC ont une dépense énergétique élevée (figure 2A) due à leur hyperactivité (figure 2B). De plus, la consommation d' O_2 mitochondriale à l'état 4 (tableau 1) ainsi que la cinétique de la fuite de protons en condition contrôle restent similaire entre les rats Lou-HC et Wistar (figure 4A). Néanmoins, lorsque les mitochondries sont incubées en présence de palmitate (figure 4B), un activateur connu de l'UCP3 (*Brand et al, 2004*), la consommation d' O_2 est significativement plus élevée (25-50%, $p < 0,01$) chez les rats Lou/C entre 135 et 173 mV (insert figure 4B). L'augmentation

de la consommation d'O₂ induite par le palmitate est inhibée par le GDP (figure 4C), suggérant que la fuite de protons peut être modulée par l'activation des protéines découplantes UCP (*Brand et al, 2004*). Le découplage est en effet considéré comme un processus majeur qui s'oppose à une production exacerbée de ROS dans des conditions où la génération d'ATP n'est pas essentielle (état 4) (*Casteilla et al, 2001*). Dans le muscle squelettique des rats Lou/C, l'expression des UCP3 (protéine découplante spécifique de ce tissu) est significativement augmentée (figure 5). Si l'effet direct de l'UCP3 sur la production mitochondriale de ROS chez cette souche de rats est difficile à évaluer, l'incubation des mitochondries isolées avec du palmitate entraîne une augmentation de la fuite de protons (figure 5). Cet effet est entravé par le GDP, un nucléotide connu pour inhiber le découplage induit par les UCP. Il est ainsi concevable que l'augmentation modérée des ARNm d'UCP3 observée chez les rats Lou/C soit suffisante pour diminuer la production d'H₂O₂ (figure 3). De plus, il est montré que les UCP3 permettent une meilleure utilisation des acides gras (*Barazzoni et al, 2005 ; Hagström-Toft et al, 2001 ; Samec et al, 1998*). Ainsi l'expression accrue de ces protéines découplantes pourrait contribuer à l'augmentation de l'oxydation des lipides observée dans le muscle squelettique des rats Lou/C (*résultats non montrés*). Cette augmentation de l'utilisation des lipides n'est pas spécifique à ce tissu ; nous la retrouvons aussi dans le foie de ces rats (*Lacraz et al, non publié*)

Consommation de lipides et production de ROS par les mitochondries de muscle squelettique

Le régime riche en lipides entraîne une augmentation de la quantité d'H₂O₂ produite par les mitochondries de muscle squelettique des Lou/C de telle sorte que la plupart des différences dans la production de ROS entre ces rats et les Wistar sont totalement abolies (figure 2). Ces altérations observées chez les rats Lou/C-HF sont dues à l'importante consommation de lipides et non à une augmentation de la prise calorique (figure 1). Cette génération accrue d'H₂O₂ se produit principalement au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire à travers le flux inverse d'électrons. D'une part, cette production est diminuée par l'ajout de roténone lorsque les mitochondries sont incubées en présence de succinate ou de G/M + succinate. D'autre part, la consommation d'O₂ à l'état 3, en présence de G/M seul, est augmentée chez les Lou/C-HF (tableau 1). Enfin, l'activité du complexe I est stimulée par le régime HF jusqu'à une valeur similaire à celle mesurée chez les rats Wistar (tableau 2). Ces

résultats suggèrent que les changements, tant quantitatifs que qualitatifs du régime, affectent la production mitochondriale de ROS. Ces modifications sont telles que les effets bénéfiques offerts par la restriction calorique sont annihilés en augmentant la teneur en lipides dans le régime. Ces résultats concordent avec ceux de Couturier *et al* (*non publié*) montrant que les rats Lou/C, bien qu'ils soient résistants à l'obésité induite par un régime riche en lipides, ne sont pas mieux protégés contre les effets délétères d'un tel traitement. En effet, le régime riche en lipides est associé, chez les rats Lou/C, à une augmentation des acides gras libres plasmatiques, à une accumulation des triglycérides hépatiques et à une légère détérioration de la tolérance au glucose. De plus, lors d'un régime standard (HC), les concentrations en adiponectine sont plus élevées chez les rats Lou/C que chez les rats Wistar, ces données étant cohérentes avec la faible adiposité des rats Lou/C. Par contre, le régime riche en lipides augmente l'adiposité dans les deux souches de rats mais diminue les concentrations d'adiponectine uniquement chez les rats Lou/C (*Couturier et al, non publié*). Or, de faibles concentrations en adiponectine peuvent induire une réduction du transport et une diminution de l'oxydation des acides gras dans le muscle squelettique (*Yamauchi et al, 2001*). Si l'oxydation des lipides n'est pas diminuée dans le muscle squelettique chez les rats Lou-HF elle reste toutefois identique à celle des rats Lou-HC alors que celle-ci est stimulée par le régime riche en lipides chez les rats Wistar (*résultats non montrés*). De plus, contrairement aux rats Lou/C, le régime riche en lipides n'altère pas la production de ROS chez les rats Wistar de sorte que la quantité d'H₂O₂ produite par les mitochondries de muscle squelettique de Wistar-HF est similaire à celle de Wistar-HC (*résultats non montrés*). Dès lors, il apparaît que les rats Lou/C sont plus sensibles aux variations de la proportion de lipides ingérée que les rats Wistar (la consommation de lipides étant similaire entre les deux souches).

Ouverture du pore de transition de perméabilité dans les mitochondries de muscle squelettique

De nombreux articles décrivent le rôle du pore de transition de perméabilité (PTP) dans le contrôle de la mort cellulaire de différents tissus (cœur, muscle squelettique, cerveau) (*Bernardi et al, 1998*). Par conséquent, l'importante capacité de rétention calcique (CRC, *ie* la quantité maximale de Ca²⁺ captée par la mitochondrie avant l'ouverture de PTP) mesurée dans les mitochondries de muscle squelettique chez les rats Lou/C soumis au régime standard

(figure 6) peut expliquer un degré d'incidence plus faible des pathologies graves ainsi qu'une plus grande longévité observés chez cette souche de rats (*Alliot et al, 2002*).

Parallèlement à cela, il est montré que les ROS influent directement sur l'ouverture du PTP (*Chen et al, 2003b ; Kroemer et al, 1997 ; Skulachev, 1996*). Cette interaction est soutenue par les résultats obtenus à partir des différentes conditions expérimentales que nous avons mises en place (substrat respiratoire, souche de rat, régime alimentaire). Ainsi, la production de ROS en présence de G/M + succinate est significativement plus faible qu'en présence de succinate seul (figure 3) et, de manière conjointe, la CRC chute de 40-50% (figure 6). Le Lou/C-HF a une production d' H_2O_2 qui est augmentée comparativement aux Lou-HC et un niveau de CRC qui est similaire à celui mesuré chez les Wistar (Figures 2 et 3). Cependant, un cercle vicieux est installé car l'ouverture du PTP génère aussi des ROS (*Batandier et al, 2004 ; Zorov et al, 2000*).

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Nos résultats apportent des éléments nouveaux sur la souche de rat Lou/C qui est caractérisée par une prise alimentaire spontanément réduite et une absence d'obésité, même lorsqu'elle est soumise à un régime riche en lipides.

Ainsi, la quantité d'H₂O₂ générée par les mitochondries de muscle squelettique des rats Lou/C est divisée par 2 par rapport à celle des rats Wistar. Ceci confirme qu'une faible prise calorique diminue le stress oxydant. Cette faible production de ROS n'est pas liée à la diminution de la consommation d'oxygène sur le corps entier mais probablement 1°) à la diminution de l'activité du complexe I (le site majeur de la production d'H₂O₂ au sein de la mitochondrie) et 2°) à l'augmentation de l'expression des UCP3. Cette diminution de la production d'H₂O₂ chez ces rats Lou/C s'accompagne d'une inhibition significative de l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP). Or, le PTP est impliqué dans le contrôle de l'apoptose. Ainsi un tel résultat pourrait contribuer au ralentissement du vieillissement observé chez cette souche de rat. Cependant, la production d'H₂O₂ est restaurée et l'inhibition du PTP levée lorsque les rats Lou/C sont soumis à un régime riche en lipides, de sorte que les valeurs obtenues chez les rats Lou/C-HF sont similaires à celles des rats Wistar. Ceci suggère que la protection contre le stress oxydant induite par le faible apport calorique est perdue lorsque la proportion de lipides dans le régime est élevée.

Un des éléments clés impliqué dans la phosphorylation oxydative, la production de radicaux libres et la régulation du pore de transition de perméabilité, concerne la structure de la membrane interne de la mitochondrie (*Merry, 2002*). Si il est observé une stimulation de l'expression des ARNm des UCP3 dans le muscle squelettique des rats Lou/C, l'augmentation de son contenu en protéine doit toutefois être confirmé. De la même manière, la composition lipidique des membranes joue un rôle déterminant, tant au niveau de la perméabilité aux protons que dans les risques de peroxydation lipidique (*Brand et al, 2003 ; Gardner, 1989 ; Hulbert, 2005 ; Porter et al, 1996*). Il est montré que d'une part, la restriction calorique diminue le degré d'insaturation (*Cefalu et al, 2000 ; Merry, 2002 ; Pamplona et al, 2002*) et que d'autre part, le régime riche en lipides modifie la composition des membranes en fonction des acides gras proposés (*Andersson et al, 2002 ; Barzanti et al, 1994 ; Mataix et al, 1998*). Il pourrait donc être intéressant de déterminer la composition lipides des membranes mitochondriales de muscle squelettique des rats Lou/C.

La diminution de la production de ROS chez les rats Lou/C peut également être liée à une stimulation des défenses antioxydantes. Afin de vérifier cette hypothèse, les mesures du système antioxydant enzymatique (SOD, GPx, catalase) et non enzymatique (GSH, vitamines) pourraient être effectuées ; d'autant qu'il a été décrit que 1°) la restriction calorique stimule les activités des enzymes antioxydantes (*Lass et al, 1998 ; Sohal et al, 1994 ; Sreekumar et al, 2002b* et que 2°) ces activités sont significativement diminuées par le régime riche en lipides (*Aliciguzel et al, 2003 ; Dincer et al, 2002 ; Roberts et al, 2006 ; Sreekumar et al, 2002a*).

ETUDE II

Depuis quelques années la teneur en sucre augmente dans l'alimentation, notamment celle en saccharose, un disaccharide composé d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose. Cependant, la consommation d'un régime riche en saccharose, même sur une courte période, entraîne des désordres métaboliques regroupés sous le terme de syndrome X ou syndrome métabolique (Reaven, 1988). Le syndrome X est caractérisé par une hypertension, une résistance à l'insuline et une dyslipidémie, ou plus exactement une hypertriglycérémie (Gutman et al 1987 ; Huang et al, 2004 ; Pagliassotti et al, 1996 ; Soria et al, 2001). McDonald (1995) définit le stress oxydant comme étant l'un des principaux mécanismes à l'origine des effets délétères induits par le saccharose. Il est en effet observé chez des rats soumis à un régime riche en saccharose (69%) : 1°) une augmentation de la peroxydation lipidique, 2°) une diminution de la SOD cytosolique (Cu/Zn-SOD), 3°) une diminution du rapport GSH/GSSG, et 4°) une augmentation des protéines de stress HSP70, (Busserolles et al, 2002b ; Busserolles et al, 2002c ; Delbosc et al, 2005 ; Faure et al, 1999, Srividhya & Anaradha, 2002).

Peu d'études se sont intéressées au fonctionnement mitochondrial lors d'un régime riche en saccharose alors que ces organites, principal lieu de la production de ROS (Boveris et al, 1972 ; Boveris & Chance, 1973), auraient un rôle déterminant à jouer dans la mise en place du syndrome X par un tel régime. Si les mitochondries sont la plus importante source de ROS, elles sont aussi le site de l'oxydation des nutriments ; or il a été montré que les métabolismes glucidique et lipidique étaient altérés par le régime riche en saccharose (69%) (Chicco et al, 2003 ; Lombardo et al, 1996).

De ce fait, nous nous proposons d'évaluer les conséquences de 3 semaines de régime riche en fructose (65%) sur la production de ROS dans les mitochondries de foie et de muscle squelettique de rats Wistar. Il a en effet été démontré que, d'une part, 3 semaines de régime riche en saccharose sont suffisantes pour induire une résistance à l'insuline dans ces deux organes (Chicco et al, 2003 ; Pagliassotti et al, 1996) et, d'autre part, c'est cette molécule de fructose qui est à la base des désordres métaboliques (Thorburn et al, 1989 ; Thresher et al, 2000). Parallèlement, un groupe de rats est traité avec de la GliSODin[®], un complément alimentaire constitué de SOD de melon et de gliadine de blé, afin de vérifier si une supplémentation en antioxydant peut contrebalancer les effets délétères d'un régime riche en fructose. 4 groupes de rats Wistar sont donc constitués : 1°) un groupe de rats soumis à un

régime standard (CHO), 2°) un groupe de rats soumis à un régime riche en fructose (65%) (FD), 3°) un groupe de rats soumis à un régime standard et traités à la GliSODin® (CHO-SOD) et enfin 4°) un groupe de rats soumis à un régime riche en fructose (65%) et traités à la GliSODin® (FD-SOD).

RESULTATS

Courbe de croissance, prise alimentaire et masse grasse

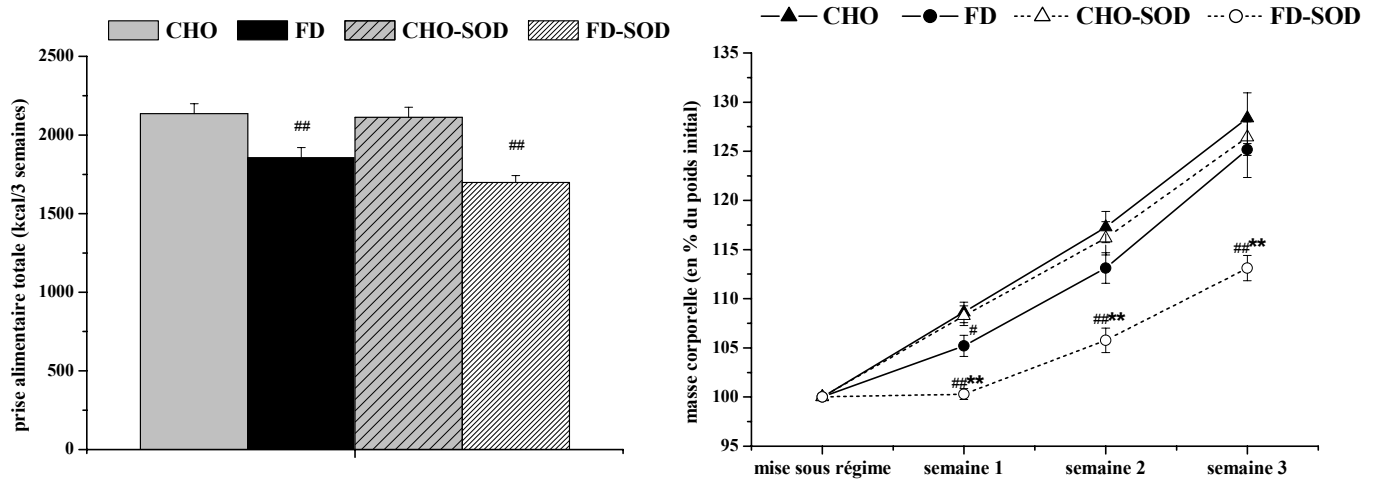


Figure 1 : Prise alimentaire et courbe de croissance de rats soumis à un régime standard (CHO) ou riche en fructose (FD) et traités à la GliSODin® (CHO-SOD, FD-SOD).

: effet du régime (CHO vs FD ou CHO-SOD vs FD-SOD), # p<0,05 ; ## p<001

* : effet de la GliSODin® (CHO vs CHO-SOD ou FD vs FD-SOD), ** p<001

Bien que la prise alimentaire soit plus faible chez les rats FD que chez les rats CHO, leurs courbes de croissance sont similaires (figure 1).

Le traitement à la GliSODin® n'entraîne aucune différence dans la prise alimentaire et dans la courbe de croissance entre les rats CHO-SOD et CHO. Par contre, avec le régime riche en fructose, la prise alimentaire des rats FD-SOD est plus faible comparativement à celle des rats CHO-SOD, et leur courbe de croissance reste inférieure à celle des 3 autres groupes.

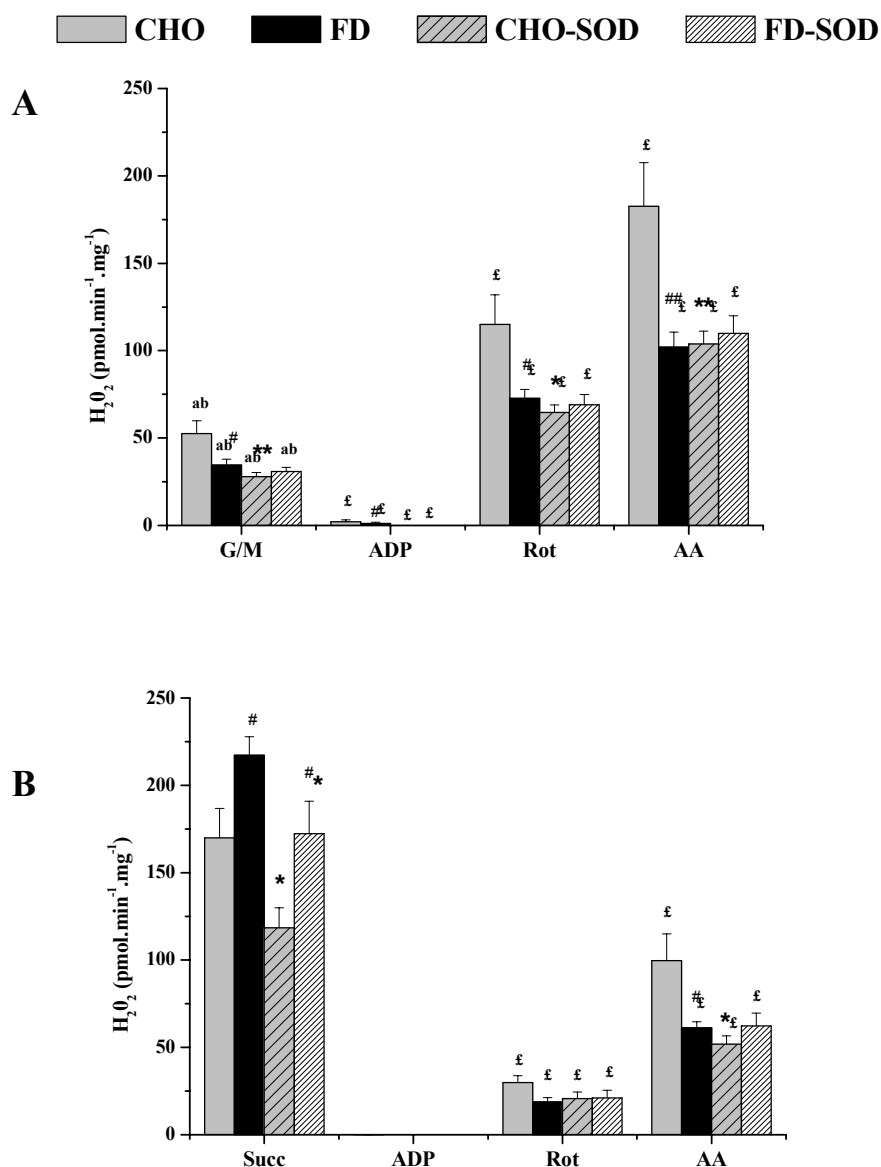
	CHO	FD	CHO-SOD	FD-SOD
Mésentérique (g/100g)	0.97 ± 0.08	0.96 ± 0.06	0.86 ± 0.06	1.09 ± 0.08
Rétropéritonéal (g/100g)	1.00 ± 0.09	1.24 ± 0.07 [#]	0.95 ± 0.14	1.31 ± 0.15

Tableau 1 : Poids relatifs du tissu adipeux mésentériques et rétropéritonéaux de rats soumis à un régime standard (CHO) ou riche en fructose (FD) et traités à la GliSODin® (CHO-SOD, FD-SOD).

Le régime riche en fructose (FD) entraîne une augmentation du poids relatif du tissu adipeux rétropéritonéal par rapport au régime standard (CHO) (tableau 1). Par contre, aucune différence significative n'est observée entre les rats FD-SOD et CHO-SOD.

Production d'H₂O₂ de mitochondries de foie et de muscle squelettique

FOIE



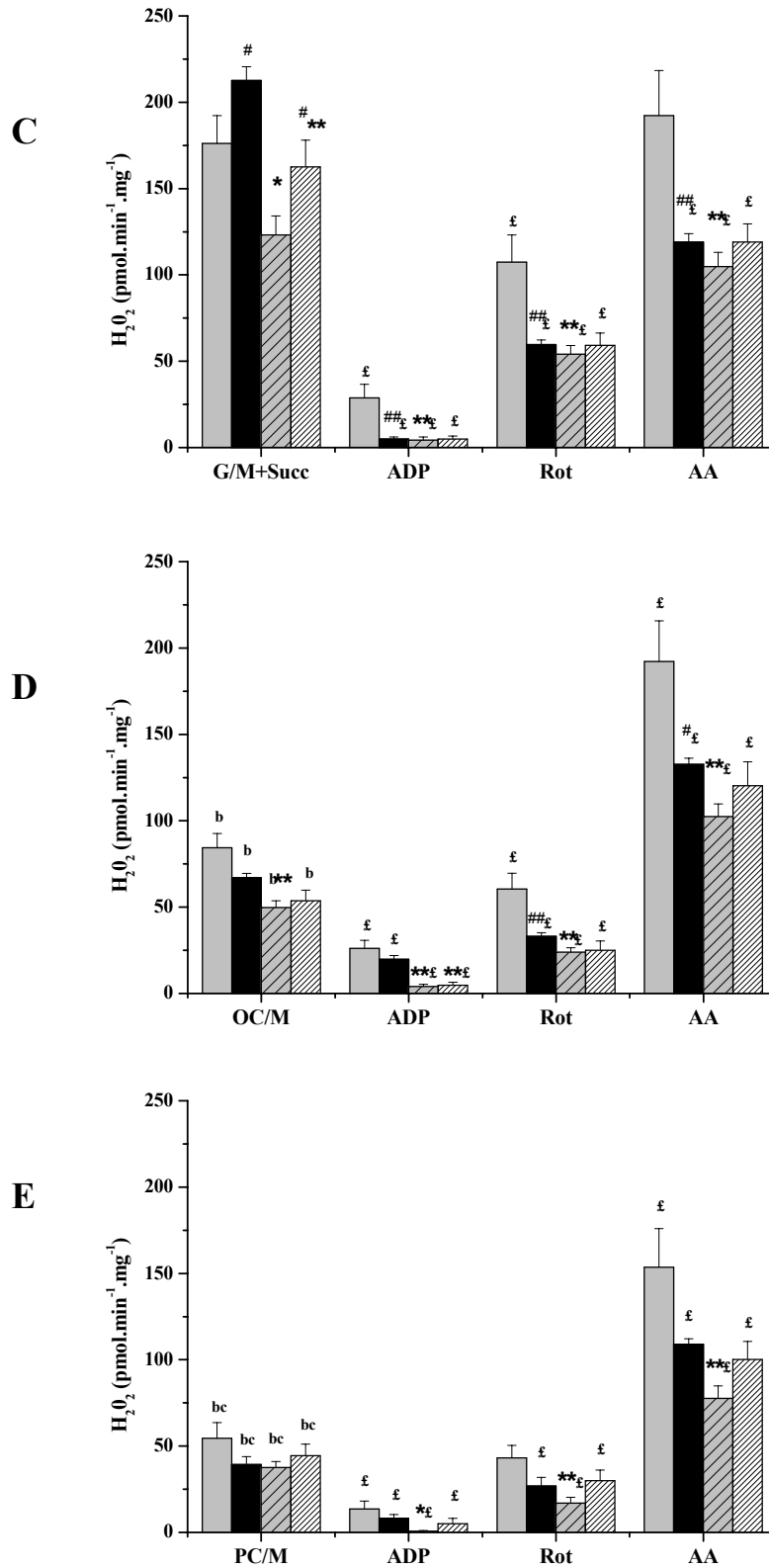


Figure 2 : Production d' H_2O_2 par les mitochondries de foie de rats soumis à un régime standard (CHO) ou riche en fructose (FD) et traités à la GliSODin® (CHO-SOD, FD-SOD). Production d' H_2O_2 en présence de différents substrats respiratoires : A. glutamate/malate, B. succinate, C. glutamate/malate + succinate, D. OctanoylCarnitine + Malate, E. PalmitoylCarnitine + Malate.

: effet du régime (CHO vs FD ou CHO-SOD vs FD-SOD), # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$

* : effet de la GliSODin® (CHO vs CHO-SOD ou FD vs FD-SOD), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

£ : significativement différent du substrat seul (dans un même groupe de rat)

a : différence significative entre substrat fournissant du $NADH, H^+$ ou du $FADH_2$ (succinate vs glutamate/malate)

b : significativement différent de glutamate/malate + succinate

c : différence significative entre les deux substrats lipidiques (octanoylcarnitine vs palmitoylcarnitine)

Effets du substrat sur la production d'H₂O₂ de mitochondries de foie

La production de ROS dans le foie est dépendante du substrat fourni aux mitochondries (figure 2). Ainsi la quantité d'H₂O₂ générée à partir du complexe I (glutamate/malate fournissant le NADH,H⁺, figure 2A) est 3 fois plus faible que celle produite à partir du complexe II (succinate fournissant du FADH₂, figure 2B). Par contre, lorsque le glutamate/malate est associé au succinate (figure 2C), la production d'H₂O₂ est similaire à celle observée en présence de succinate seul. En présence de glutamate/malate, l'augmentation de la production d'H₂O₂, après ajout successif de la roténone et d'antimycine A, confirme que les sites de production de ROS se trouvent au niveau des complexes I et III (figure 2A). De même, la diminution significative de la production d'H₂O₂ lorsque les mitochondries sont incubées avec du succinate et de la roténone, met en évidence le flux inverse d'électrons qui remonte du complexe II au complexe I (figure 2B).

Bien que les substrats lipidiques fournissent du NADH,H⁺ et du FADH₂, la quantité d'H₂O₂ générée n'est pas semblable à celle produite en présence de G/M/S (figure 2C, D et E). Toutefois, la production d'H₂O₂ en palmitoylcarnitine + malate est du même ordre de grandeur qu'en glutamate/malate alors qu'elle est 1,5 fois plus importante en octanoylcarnitine + malate.

Après addition d'ADP, les mitochondries respirant, soit avec du glutamate/malate, soit avec du succinate, ont une production d'H₂O₂ quasiment nulle. Néanmoins, une modeste production de ROS subsiste à l'état 3 si les équivalents réduits (NADH,H⁺ et FADH₂) sont fournis simultanément au niveau des complexes I et II (glutamate/malate + succinate et substrats lipidiques).

Effets du régime riche en fructose sur la production d'H₂O₂ de mitochondries de foie

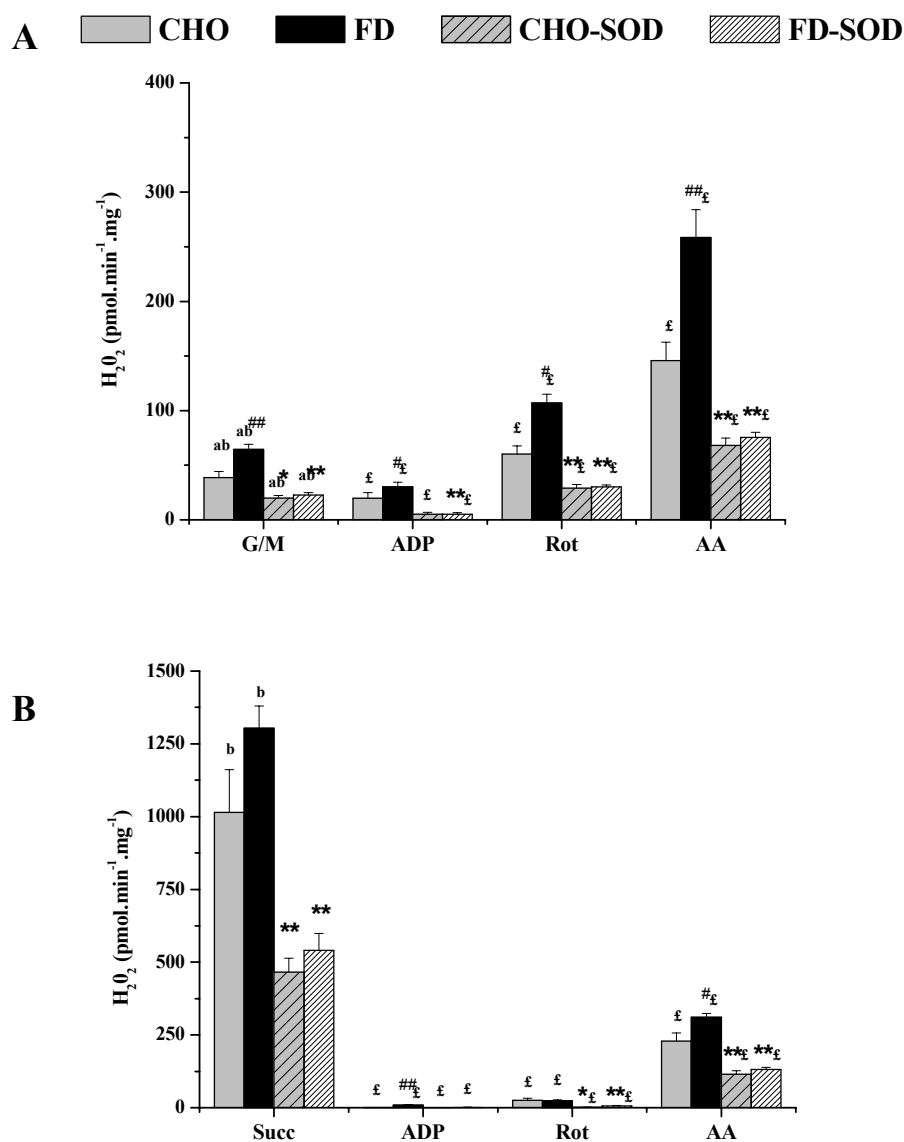
Le régime riche en fructose (FD) entraîne une diminution d'environ 30% de la production de ROS dans le foie, excepté lorsque les mitochondries sont incubées en présence de succinate (seul ou associé au glutamate/malate) où elle est augmentée de 25% (figure 2). Après l'ajout d'inhibiteurs (roténone ou antimycine A), la quantité d'H₂O₂ générée par les mitochondries de foie de rats FD par rapport aux rats CHO est 30% à 45% plus faible selon le substrat.

Effets du traitement à la GliSODin® sur la production d'H₂O₂ de mitochondries de foie

Lorsque les rats sont soumis au régime standard, le traitement à la GliSODin® diminue la production d'H₂O₂ comparativement aux rats non traités, et ce pour tous les substrats, en présence ou non d'inhibiteurs (roténone ou antimycine) (figure 2).

Lorsque les rats sont soumis au régime riche en fructose, la production de ROS n'est pas modifiée par le traitement à la GliSODin, excepté en présence de succinate (seul ou associé au glutamate/malate) où la quantité d'H₂O₂ générée est diminuée. Ainsi, en absence de succinate la production de ROS chez les rats FD-SOD est comparable à celle des rats FD, alors qu'en présence de succinate, elle est semblable à celle des rats CHO.

MUSCLE SQUELETTIQUE



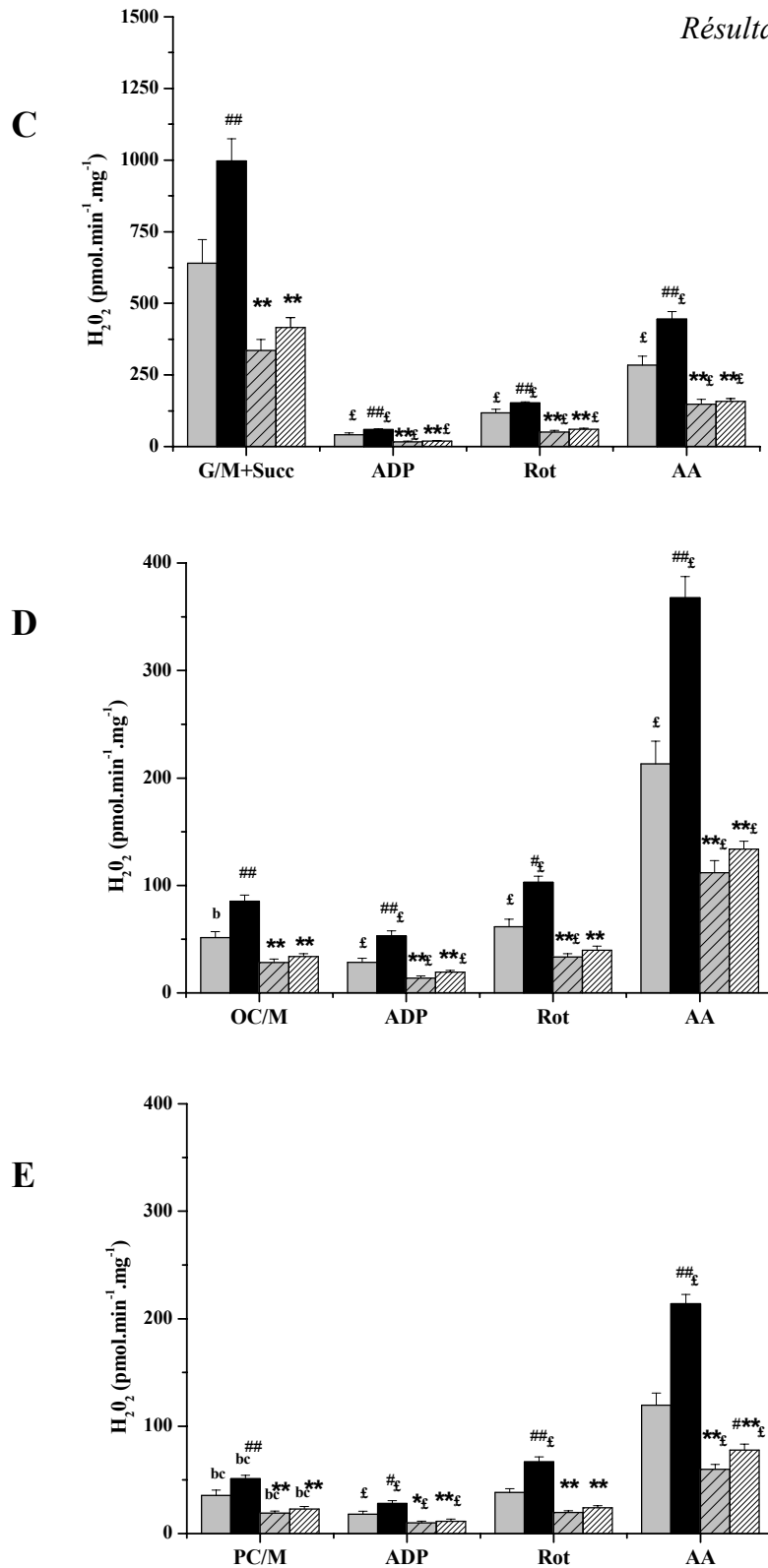


Figure 3 : Production d' H_2O_2 par les mitochondries de muscle squelettique de rats soumis à un régime standard (CHO) ou riche en fructose (FD) et traités à la GliSODin® (CHO-SOD, FD-SOD). Production d' H_2O_2 en présence de différents substrats respiratoires : A. glutamate/malate, B. succinate, C. glutamate/malate + succinate, D. OctanoylCarnitine + Malate, E. PalmitoylCarnitine + Malate.

: effet du régime (CHO vs FD ou CHO-SOD vs FD-SOD), # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$

* : effet de la GliSODin® (CHO vs CHO-SOD ou FD vs FD-SOD), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

£ : significativement différent du substrat seul (dans un même groupe de rat)

a : différence significative entre substrat fournissant du $NADH, H^+$ ou du $FADH_2$ (succinate vs glutamate/malate)

b : significativement différent de glutamate/malate + succinate

c : différence significative entre les deux substrats lipidiques (octanoylcarnitine vs palmitoylcarnitine)

Effets du substrat sur la production d'H₂O₂ de mitochondries de muscle squelettique

La production mitochondriale de ROS dans le muscle squelettique dépend également du substrat fourni aux mitochondries (figure 3). La quantité d'H₂O₂ générée à partir de substrat du complexe I (glutamate/malate fournissant de NADH,H⁺ (figure 3A) ne représente que 5% de celle produite à partir du complexe II (succinate fournissant du FADH₂, figure 3B). Lorsque les mitochondries respirent simultanément en glutamate/malate et en succinate (figure 3C), la production d'H₂O₂ est réduite comparativement à celle en présence de succinate seul. Avec les substrats lipidiques (octanoylcarnitine + malate, palmitoylcarnitine + malate figure 3D et E), la production d'H₂O₂ est similaire à celle obtenue en glutamate/malate. Comme précédemment décrit pour le foie, la diminution significative de la production d'H₂O₂ en présence de succinate + roténone traduit l'existence du flux inverse d'électrons (figure 3B). Ce phénomène n'est donc pas spécifique du tissu étudié.

Après addition d'ADP (respiration active ou état 3), la production d'H₂O₂ s'effondre totalement avec les substrats fournissant séparément du NADH,H⁺ (glutamate/malate) ou du FADH₂ (succinate). Cette production d'H₂O₂ ne disparaît pas entièrement si les équivalents réduits sont simultanément donnés au niveau des complexes I et II (glutamate/malate + succinate et substrats lipidiques).

Effets du régime riche en fructose sur la production d'H₂O₂ de mitochondries de muscle squelettique

Quel que soit le substrat respiratoire, avec ou sans d'inhibiteur (excepté en succinate + roténone), la production mitochondriale d'H₂O₂ chez les rats soumis à un régime riche en fructose (FD) est significativement augmentée comparativement à celle des rats soumis au régime standard (CHO) (figure 3)

Effets de la GliSODin[®] sur la production d'H₂O₂ de mitochondries de muscle squelettique

Le traitement à la GliSODin[®] entraîne une diminution de la production mitochondriale d'H₂O₂ par rapport aux rats non traités (CHO-SOD vs CHO et FD-SOD vs FD) de telle sorte que les taux d'H₂O₂ produits chez les rats CHO-SOD et FD-SOD sont similaires. Cette

diminution est de 50% chez les CHO-SOD et de 60 à 70% chez les FD-SOD quelles que (figure 3) soient les conditions expérimentales : mitochondries incubées avec le substrat seul, en présence de roténone ou d'antimycine A.

Production d'H₂O₂ par molécule d'oxygène consommée

La production de ROS étant étroitement corrélée à la respiration mitochondriale, nous avons jugé nécessaire de rapporter la quantité d'H₂O₂ produite par oxygène consommé.

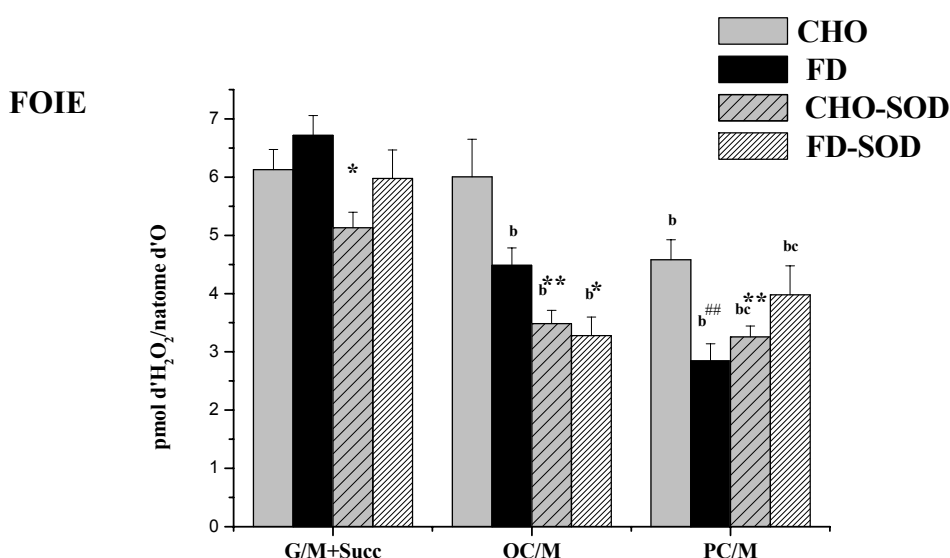


Figure 4 : Production d'H₂O₂ par natome d'oxygène consommé (à l'état 2) par les mitochondries de foie de rats soumis à un régime standard (CHO) ou riche en fructose (FD) et traités à la GliSODin® (CHO-SOD, FD-SOD).

: effet du régime (CHO vs FD ou CHO-SOD vs FD-SOD), # p<0,05 ; ## p<001

* : effet de la GliSODin® (CHO vs CHO-SOD ou FD vs FD-SOD), * p<0,05 ; ** p<001

b : significativement différent de glutamate/malate + succinate

c : différence entre les deux substrats lipidiques (octanoylcarnitine vs palmitoylcarnitine)

Dans les mitochondries de foie de rats CHO, la production d'H₂O₂ par oxygène consommé est du même ordre de grandeur en glutamate/malate + succinate et en octanoylcarnitine alors qu'elle est plus faible en palmitoylcarnitine (figure 4).

Le régime fructose ne diminue significativement la quantité d'H₂O₂ par natome d'O que lorsque les mitochondries sont incubées en présence de palmitoylcarnitine. Par contre, le traitement à la GliSODin® diminue cette production de ROS quel que soit le substrat respiratoire chez les rats soumis au régime standard, et en présence d'octanoylcarnitine chez

les rats soumis au régime riche en fructose. Cette production est augmentée chez les rats FD-SOD en palmitoylcarnitine + malate comparativement aux rats FD.

MUSCLE SQUELETTIQUE

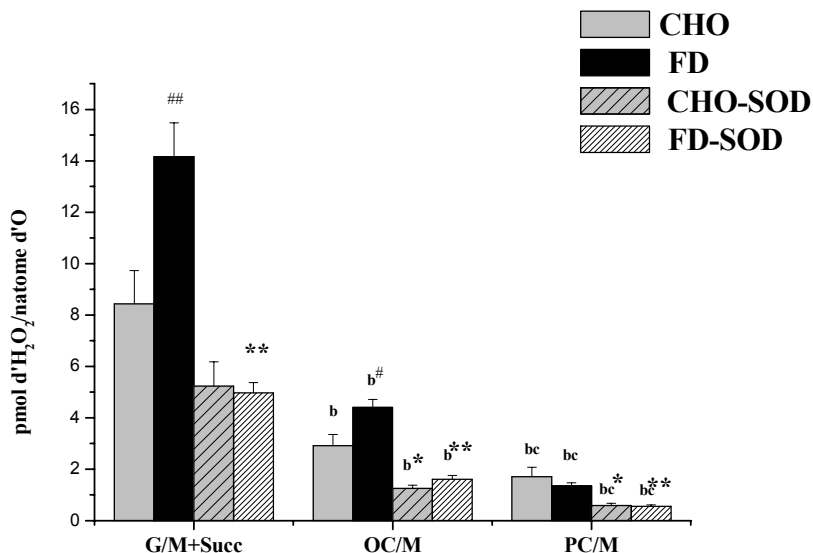


Figure 5 : Production d'H₂O₂ par natome d'oxygène consommé (à l'état 2) par les mitochondries de muscle squelettique de rats soumis à un régime standard (CHO) ou riche en fructose (FD) et traités à la GliSODin® (CHO-SOD, FD-SOD).

: effet du régime (CHO vs FD ou CHO-SOD vs FD-SOD), # p<0,05 ; ## p<001

* : effet de la GliSODin® (CHO vs CHO-SOD ou FD vs FD-SOD), * p<0,05 ; ** p<001

b : significativement différent de glutamate/malate + succinate

c : différence entre les deux substrats lipidiques (octanoylcarnitine vs palmitoylcarnitine)

Dans les mitochondries de muscle squelettique, la production d'H₂O₂ par natome d'O est plus importante chez les rats FD que chez les rats CHO en glutamate/malate+ succinate et en octanoylcarnitine + malate (figure 5).

La GliSODin® entraîne une diminution significative de cette production quel que soit le régime alimentaire. Par conséquent, les rats CHO-SOD et FD-SOD ont une production d'H₂O₂ par natome d'O similaire.

Consommation d'oxygène de mitochondries de foie et muscle squelettique

Les activités respiratoires mesurées sous différentes conditions, notamment aux états 4 (respiration basale) et 3 (respiration active, oxydation phosphorylante), nous donnent des indications complémentaires sur le fonctionnement de la mitochondrie.

FOIE

		CHO	FD	CHO – SOD	FD – SOD	Anova		
						R	G	R*G
GLUT/MAL	Etat 4	8.9 ± 0.7 ^{ab}	10.3 ± 0.6 ^{ab}	8.5 ± 0.5 ^{ab}	9.1 ± 0.8 ^{ab}	ns	ns	ns
	Etat 3	145 ± 6 ^{ab}	162 ± 6 ^{#ab}	145 ± 9 ^{ab}	157 ± 8 ^{ab}	P<0,05	ns	ns
	RCR	17.0 ± 1.3 ^{ab}	16.3 ± 1.4 ^{ab}	17.3 ± 0.9 ^{ab}	17.6 ± 0.8 ^{ab}	ns	ns	ns
SUCCINATE	Etat 4	17.8 ± 0.9 ^b	21.5 ± 1.0 ^{#b}	18.8 ± 1.0	21.4 ± 1.3 ^b	P<0,01	ns	ns
	Etat 3	200 ± 10	214 ± 3	176 ± 5	212 ± 11 [#]	P<0,01	ns	ns
	RCR	10.7 ± 0.5 ^b	9.7 ± 0.4	9.8 ± 0.2	10.0 ± 0.3 ^b	ns	ns	ns
GLUT/MAL+SUCC	Etat 4	21.9 ± 1.3	25.0 ± 0.8	20.8 ± 1.1	24.3 ± 1.3 [#]	P<0,01	ns	ns
	Etat 3	199 ± 8	216 ± 4	193 ± 9	216 ± 9	P<0,05	ns	ns
	RCR	9.2 ± 0.5	8.9 ± 0.3	9.3 ± 0.3	8.9 ± 0.2	ns	ns	ns
OCTANOYL/MAL	Etat 4	9.6 ± 0.6 ^b	14.3 ± 0.4 ^{##b}	11.6 ± 0.5 ^{*b}	11.8 ± 0.9 ^{*b}	P<0,01	ns	P<0,01
	Etat 3	113 ± 4 ^b	124 ± 4 ^b	111 ± 4 ^b	122 ± 5 ^b	P<0,05	ns	ns
	RCR	12.0 ± 0.6 ^b	8.5 ± 0.1 ^{##}	9.7 ± 0.3 ^{**}	10.6 ± 0.7 ^{**b}	P<0,01	ns	P<0,01
PALMITOYL/MAL	Etat 4	10.9 ± 0.5 ^b	13.1 ± 0.6 ^b	9.6 ± 1.0 ^{bc}	9.7 ± 0.4 ^{**bc}	ns	P<0,01	ns
	Etat 3	114 ± 6 ^b	128 ± 3 ^b	117 ± 6 ^b	121 ± 4 ^b	ns	ns	ns
	RCR	10.1 ± 0.9	9.9 ± 0.4 ^{bc}	12.8 ± 1.0 ^{bc}	12.5 ± 0.2 ^{**b}	ns	P<0,01	ns
TMPD		173 ± 13	178 ± 6	152 ± 10	173 ± 7	ns	ns	ns
DNP		228 ± 10	245 ± 6	217 ± 5	242 ± 10 [#]	P<0,01	ns	ns

Tableau 2 : Consommation d'oxygène (natome d'O.min⁻¹. mg⁻¹) par les mitochondries de foie de rats soumis à un régime standard (CHO) ou riche en fructose (FD) et traités à la GliSODin® (CHO-SOD, FD-SOD).

Anova : (R) : Régime, (G) : GliSODin®, (R * G) : Régime * GliSODin®

: effet du régime (CHO vs FD ou CHO-SOD vs FD-SOD), # p<0,05 ; ## p<001

* : effet de la GliSODin® (CHO vs CHO-SOD ou FD vs FD-SOD), * p<0,05 ; ** p<001

a : différence significative entre substrat fournissant du NADH, H⁺ ou du FADH₂ (succinate vs glutamate/malate)

b : significativement différent de glutamate/malate + succinate

c : différence significative entre les deux substrats lipidiques (octanoylcarnitine vs palmitoylcarnitine)

Dans le foie, les respirations basale (oligomycine, état 4) et active (ADP, état 3) sont plus importantes en succinate qu'en glutamate/malate (tableau 2). Par contre, lorsque les mitochondries sont stimulées simultanément au niveau des 2 complexes (glutamate/malate + succinate), la consommation d'O₂ est similaire à celle obtenue en présence de succinate seul. Avec les substrats lipidiques, les respirations à l'état 3 et à l'état 4 sont identiques entre un acide gras à chaîne moyenne (octanoylcarnitine) et un à chaîne longue (palmitoylcarnitine).

Le régime riche en fructose a peu de conséquences sur l'état 3 de la respiration mitochondriale, par contre il entraîne une augmentation significative de l'état 4 en présence de succinate et d'octanoylcarnitine. Une diminution du RCR (rapport du contrôle respiratoire) en octanoylcarnitine + malate est observée chez les FD comparativement au CHO.

Les effets de la GliSODin[®] sur la respiration mitochondriale se manifeste principalement avec l'utilisation des substrats lipidiques. Le RCR est diminué en octanoylcarnitine + malate chez les CHO-SOD comparativement au CHO alors qu'il est augmenté chez les FD-SOD par rapport au FD. En présence de palmitoylcarnitine + malate, le RCR est augmenté chez les rats FD-SOD.

Aucune différence n'est observée entre les différents groupes expérimentaux en présence de TMPD. Par contre, une augmentation de la consommation d'oxygène en présence de DNP est obtenue chez les rats FD-SOD comparativement aux rats CHO-SOD.

MUSCLE SQUELETTIQUE

		CHO	FD	CHO - SOD	FD - SOD	Anova		
						R	G	R*G
GLUT/MAL	Etat 4	18.1 ± 1.6 ^{ab}	17.1 ± 1.0 ^{ab}	18.3 ± 1.2 ^{ab}	16.5 ± 1.4 ^{ab}	ns	ns	ns
	Etat 3	364 ± 12 ^{ab}	420 ± 15 ^{#ab}	432 ± 20 ^{**ab}	466 ± 37 ^{ab}	P<0,05	P<0,05	ns
	RCR	21.1 ± 1.6 ^{ab}	24.1 ± 1.4 ^{ab}	23.9 ± 1.6 ^{ab}	25.2 ± 4.7 ^{ab}	ns	ns	ns
SUCCINATE+ROT	Etat 4	55.2 ± 3.9	68.4 ± 2.8 ^b	70.6 ± 5.0	72.3 ± 8.7	ns	ns	ns
	Etat 3	301 ± 10 ^b	303 ± 10 ^b	340 ± 21 ^b	372 ± 16 ^{**b}	ns	P<0,01	ns
	RCR	5.6 ± 0.3 ^b	4.6 ± 0.1 ^{###b}	4.9 ± 0.3 ^b	4.5 ± 0.1 ^b	P<0,01	ns	ns
GLUT/MAL+SUCC	Etat 4	59.4 ± 4.3	59.4 ± 2.8	66.9 ± 3.0	72.3 ± 3.5 [*]	ns	P<0,01	ns
	Etat 3	496 ± 23	516 ± 17	559 ± 18	608 ± 28 [*]	ns	P<0,01	ns
	RCR	8.6 ± 0.6	8.5 ± 0.3	8.4 ± 0.3	8.5 ± 0.3	ns	ns	ns
OCTANOYL/MAL	Etat 4	16.0 ± 1.0 ^b	18.5 ± 1.0 ^b	15.4 ± 2.1 ^b	22.0 ± 1.7 ^{#b}	P<0,01	ns	ns
	Etat 3	124 ± 6 ^b	133 ± 4 ^b	145 ± 9 ^b	156 ± 8 ^{*b}	ns	P<0,01	ns
	RCR	8.0 ± 0.5	7.5 ± 0.3	8.8 ± 1.8	7.3 ± 0.5	ns	ns	ns
PALMITOYL/MAL	Etat 4	19.1 ± 1.0 ^{bc}	27.5 ± 1.4 ^{###bc}	22.0 ± 0.0 ^{*bc}	32.2 ± 2.5 ^{###bc}	P<0,01	P<0,05	ns
	Etat 3	174 ± 8 ^b	153 ± 13 ^b	166 ± 28 ^b	188 ± 13 ^b	ns	ns	ns
	RCR	9.4 ± 0.8	5.6 ± 0.5 ^{###bc}	7.5 ± 1.3	6.5 ± 0.3 ^b	P<0,05	ns	ns
TMPD		487 ± 23	492 ± 17	547 ± 37	624 ± 32 [*]	ns	P<0,01	ns
DNP		688 ± 31	686 ± 13	822 ± 39 [*]	856 ± 16 ^{**}	ns	P<0,01	ns

Tableau 3 : Consommation d'oxygène (natome d'O.min⁻¹.mg⁻¹) par les mitochondries de muscle squelettique de rats soumis à un régime standard (CHO) ou riche en fructose (FD) et traités à la GliSODin® (CHO-SOD, FD-SOD).

Anova : (R) : Régime, (G) : GliSODin®, (R * G) : Régime * GliSODin®

: effet du régime (CHO vs FD ou CHO-SOD vs FD-SOD), # p<0,05 ; ## p<001

* : effet de la GliSODin® (CHO vs CHO-SOD ou FD vs FD-SOD), * p<0,05 ; ** p<001

a : différence significative entre substrat fournissant du NADH,H⁺ ou du FADH₂ (succinate vs glutamate/malate)

b : significativement différent de glutamate/malate + succinate

c : différence significative entre les deux substrats lipidiques (octanoylcarnitine vs palmitoylcarnitine)

Dans les mitochondries de muscle squelettique, la consommation d'O₂ à l'état 3 en présence de glutamate/malate est plus importante qu'en succinate seul mais plus faible qu'en présence de ces 2 substrats combinés (tableau 3). Avec les substrats lipidiques, cette respiration active est plus élevée en palmitoylcarnitine + malate qu'en octanoylcarnitine + malate.

Le régime riche en fructose a peu d'influence sur les différents états de respiration mitochondriale. Il entraîne toutefois une diminution du RCR en succinate + roténone et en palmitoylcarnitine + malate.

Le traitement à la GliSODin[®] n'a pas les mêmes effets selon régime alimentaire employé. La respiration à l'état 3 est significativement augmentée chez les CHO-SOD comparativement au CHO lorsque les mitochondries sont incubées avec du glutamate/malate ou de l'octanoylcarnitine + malate. Cette respiration active est également augmentée en octanoylcarnitine + malate ainsi qu'en succinate (seul ou associé au glutamate/malate) chez les FD-SOD par rapport au FD. Des différences existent aussi entre les deux groupes traités : les rats FD-SOD ont une consommation d'oxygène à l'état 4 plus élevée que celle mesurée chez les rats CHO-SOD lorsque les mitochondries sont incubées avec les substrats lipidiques.

La consommation d'O₂ en présence de TMPD est plus importante chez les rats FD-SOD que chez les rats FD. En présence du découplant DNP, la consommation d'O₂ est augmentée dans les deux groupes traités à la GliSODin[®] comparativement aux groupes non traités.

Activités enzymatiques de la chaîne respiratoire mitochondriale du foie et du muscle squelettique

L'activité des différents complexes peut également nous informer d'avantage sur l'état de la chaîne respiratoire mitochondriale.

FOIE

	CHO	FD	CHO - SOD	FD - SOD
Complex I (nmol/min/mg protéine)	94 ± 10	96 ± 5	78 ± 4	97 ± 10
Complex II (nmol/min/mg protéine)	183 ± 10	209 ± 6 [#]	179 ± 3	207 ± 14
Complex IV (nmol/min/mg protéine)	812 ± 26	984 ± 56	901 ± 53	916 ± 59
Citrate Synthase (nmol/min/mg protéine)	251 ± 11	255 ± 11	235 ± 7	249 ± 16
CI/CS (10⁻²)	41 ± 6	38 ± 2	32 ± 2	39 ± 4
CII/CS (10⁻²)	70 ± 3	83 ± 4 ^{##}	75 ± 3	83 ± 3
CIV/CS	3.0 ± 0.2	3.9 ± 0.4 [#]	3.5 ± 0.2	3.7 ± 0.3

Tableau 4 : Activités des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale de foie de rats soumis à un régime standard (CHO) ou riche en fructose (FD) et traités à la GliSODin® (CHO-SOD, FD-SOD).

: effet du régime (CHO vs FD ou CHO-SOD vs FD-SOD) ; [#]p<0,05 ; ^{##}p<0,01

MUSCLE

	CHO	FD	CHO - SOD	FD - SOD
Complex I (nmol/min/mg protéine)	140 ± 14	201 ± 20	144 ± 20	141 ± 21
Complex II (nmol/min/mg protéine)	368 ± 17	357 ± 8	361 ± 27	427 ± 36
Complex IV (nmol/min/mg protéine)	5664 ± 166	5704 ± 158	5972 ± 224	6233 ± 165
Citrate Synthase (nmol/min/mg protéine)	2520 ± 52	2442 ± 111	2451 ± 73	2406 ± 125
CI/CS (10⁻³)	56 ± 5	80 ± 8	59 ± 7	59 ± 8
CII/CS (10⁻³)	147 ± 7	150 ± 7	146 ± 8	182 ± 21
CIV/CS	2.19 ± 0.05	2.36 ± 0.11	2.40 ± 0.05	2.47 ± 0.10

Tableau 5 : Activités des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale de muscle squelettique de rats soumis à un régime standard (CHO) ou riche en fructose (FD) et traités à la GliSODin® (CHO-SOD, FD-SOD).

: effet du régime (CHO vs FD ou CHO-SOD vs FD-SOD) ; [#]p<0,05

* : effet de la GliSODin® (CHO vs CHO-SOD ou FD vs FD-SOD), ^{*}p<0,05

Dans les mitochondries de foie, les activités du complexe II (succinate deshydrogénase oxydoréductase) et du complexe IV (cytochrome C oxydase) sont significativement augmentées chez les rats FD par rapport aux rats CHO (tableau 4).

Dans les mitochondries de muscle squelettique, aucune différence significative n'est observée entre les différents groupes (tableau 5).

DISCUSSION

Malgré une prise alimentaire plus faible et une masse de tissu adipeux rétro-péritonéal plus importante, la courbe de croissance des rats soumis au régime riche en fructose (FD) est similaire à celle des rats soumis au régime standard (CHO) (figure 1, tableau 1). Il semble donc que non seulement la quantité mais également la qualité des glucides ingérés sont à considérer. Nos résultats obtenus sur la croissance et les tissus adipeux concordent avec les données de la littérature car peu d'altérations sur ces paramètres ont été effectivement observées jusqu'à 15 semaines de régime riche en fructose ou en saccharose (*Pagliassotti et al, 1996 ; Soria et al, 2001*). Après 15 semaines de régime, nous pouvons toutefois noter un gain de poids (*Chicco et al, 2003*) ainsi qu'une augmentation du diamètre des cellules adipeuses (*Soria et al, 2001*). Le traitement à la GliSODin® n'a aucune influence sur les rats CHO. Par contre, chez les rats FD-SOD, la courbe de croissance est ralentie par rapport aux rats FD bien que leurs prises alimentaires et les masses des tissus adipeux soient les mêmes.

Production de ROS par les mitochondries de foie et de muscle squelettique

Le régime fructose n'a pas les mêmes effets sur la production mitochondriale de ROS selon le tissu étudié. La production de ROS dans les mitochondries de foie est diminuée en présence des différents substrats (excepté en présence de succinate, seul ou associé au glutamate/malate) alors qu'elle est augmentée dans les mitochondries de muscle squelettique. Ces résultats confirment que la production de ROS est étroitement dépendante du tissu considéré (*Barja, 1999 ; St Pierre et al, 2002*). Toutefois nous retrouvons de fortes similitudes entre ces deux tissus quel que soient les conditions (régime alimentaire ou traitement à la GliSODin®). En effet, la majorité des ROS est produite :

1°) lors de la respiration basale (état 4), alors qu'à l'état 3 (respiration est couplée à la phosphorylation) elle est drastiquement diminuée voire quasi nulle (*Boveris & Chance, 1973 ; Barja, 2002 ; Gredilla et al, 2001b*).

2°) au niveau du complexe I *via* le flux inverse d'électrons. Ceci est mis en évidence par la forte production de ROS en présence de succinate (seul ou associé au glutamate/malate) qui est inhibée par l'ajout de roténone (inhibiteur du complexe I) (*Barja, 2002 ; Liu et al, 2002 ; St Pierre et al, 2002*).

De nombreuses études utilisent des substrats qui alimentent la chaîne respiratoire soit au niveau du complexe I, soit au niveau du complexe II. Or, dans les conditions physiologiques, les mitochondries sont stimulées simultanément avec du NADH,H^+ et du FADH_2 , ce que nous essayons de mimer en associant le glutamate/malate avec le succinate (G/M/S). Nous pouvons penser que la production de ROS en présence de G/M/S serait la somme de la production en glutamate/malate seul et succinate seul, or ce n'est pas le cas. En effet, la production de ROS en présence des deux substrats est, respectivement dans le foie et dans le muscle squelettique, similaire ou plus faible qu'en présence de succinate seul (figure 2 et 3).

Il nous est également possible de fournir à la chaîne respiratoire des équivalents réduits NADH,H^+ et FADH_2 en incubant les mitochondries avec des substrats lipidiques (octanoylcarnitine, acides gras à chaîne moyenne ou palmitoylcarnitine, acides gras à chaîne longue). Cependant, la production de ROS avec les substrats lipidiques se démarque de celle en présence de G/M/S. Elle est à la fois plus faible et peu modifiée par l'ajout de roténone, mettant ainsi en évidence que le principal site de production de ROS pendant la β -oxydation n'est pas le complexe I. Cette différence de profil entre acides gras et G/M/S peut venir de la différence de proportion des équivalents réduits fournis par ces différents substrats ; le rapport NADH,H^+ sur FADH_2 étant de 4 lors du catabolisme des glucides alors qu'il n'est que de 2 pour les acides gras. De plus, l'oxydation des acides gras, contrairement aux substrats glucidiques, fait intervenir les ETF (Electron Transfer Flavoprotein) et les ETF-QOR (Electron Transfer Flavoprotein Quinone OxydoReductase). L'ETF est un accepteur d'électrons de huit déshydrogénases primaires dans la matrice mitochondriale comprenant ceux de la β -oxydation. L'ETF-QOR est une enzyme qui catalyse le transfert d'électrons de l'ETF au Coenzyme Q de la chaîne respiratoire mitochondriale (*Beckmann & Freeman, 1985 ; Ramsay et al, 1987*). Toutefois, l'ETF et l'ETF-QOR se retrouvent être également des sources de ROS par leurs états partiellement réduits durant le métabolisme des lipides (*St Pierre et al, 2002*). En effet, l'ETF est rapidement réduit sous la forme de semiquinone ($\text{ETF}^\cdot$) et n'est stabilisé que plus tardivement sous sa forme totalement réduite (*Ramsay et al, 1987*). La ETF-QOR est entièrement réduite en acceptant 3 électrons, mais elle ne capte que 2 électrons lorsque ceux-ci proviennent directement de l'ETF, la rendant ainsi instable (*Beckmann & Freeman, 1985*). Parallèlement, Vanhove *et al* (1993) montrent que la première étape de la β -oxydation dans le foie est aussi une source de ROS à travers l'acyl-CoA déshydrogénase. Cette enzyme permet la désaturation de l'acyl-CoA en 2-trans-enoyl-CoA mais, en présence d'acides gras à chaîne courte et en absence d'accepteur d'électrons disponible, elle peut

fonctionner comme une oxydase et produisent ainsi de l' H_2O_2 . Ces mêmes auteurs montrent que la acyl-CoA déshydrogénase à chaîne longue n'a pas cette capacité de fonctionner comme une oxydase, ce qui pourrait expliquer en partie la différence de production de ROS entre octanoylcarnitine et palmitoylcarnitine. En effet, la quantité d' H_2O_2 produite en présence d'octanoylcarnitine est légèrement plus importante qu'en présence de palmitoylcarnitine. La chaîne respiratoire mitochondriale joue malgré tout un rôle important dans la production de ROS lors de l'oxydation des acides gras, et ce par la forte augmentation d' H_2O_2 qu'induit l'ajout d'antimycine A, impliquant ainsi le complexe III (figure 2 et 3).

Régime riche en fructose et production de ROS par les mitochondries de foie

Lorsque les mitochondries de foie de rats FD sont incubées en présence de substrat fournissant du NADH, H^+ (glutamate/malate), la production d' H_2O_2 est diminuée de 30% comparativement aux rats CHO (figure 2A). De même, les productions de ROS en présence d'inhibiteurs (roténone et antimycine A) sont plus faibles chez les rats FD que chez les rats CHO, quel que soit le substrat respiratoire (figure 2). Si Spolarics & Meyenhofer (2000) n'ont pas regardé la production de ROS dans leur étude, ils observent néanmoins une stimulation des défenses antioxydantes. En effet, les activités de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) et du glutathion réduit (GSH) sont augmentées dans plusieurs types cellulaires du foie (cellules endothéliales sinusoïdales et cellules parenchymateuses) de rat soumis à un régime riche en saccharose. La G6PDH fournit du NADPH à la glutathion peroxydase (GPx) et peut être également à l'origine de l'augmentation du GSH. Tous ces facteurs concourent à une meilleure détoxification de la cellule en convertissant l' H_2O_2 en H_2O . Toutefois, il nous est impossible de relier directement la diminution de la production de ROS observée chez les rats FD avec cette augmentation des défenses antioxydantes. D'une part, la durée du régime riche en fructose diffère considérablement entre ces 2 études (48h vs 3 semaines). D'autre part, cette stimulation des défenses antioxydantes paraît transitoire car des diminutions du contenu en GSH et de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, GPx, catalase) sont obtenues dans le foie de rats soumis à des régimes riche en fructose sur une plus longue durée (10 jours et 4 semaines) (Armatcu et al, 2005 ; Srividhya & Anuradha, 2002). La cytochrome c oxydase est également définie comme étant un système de défense antioxydante (Capitanio et al, 1996 ; Papa et al, 1997) et une augmentation de son activité (tableau 5) pourrait concourir à la diminution de la production de ROS. Cependant, la quantité d' H_2O_2 , lorsque les

mitochondries sont stimulées au niveau du complexe II (succinate), est plus élevée de 25% chez les rats FD que chez les rats CHO (figure 2). L'activité accrue du complexe II observée chez les rats FD (tableau 5) peut contribuer à cette augmentation de la production de ROS. La stimulation de ce complexe respiratoire pourrait en effet entraîner une augmentation du flux inverse d'électrons atteignant le site de production de ROS du complexe I. Cette hypothèse est renforcée par la disparition de cette différence de production de ROS entre les deux groupes après l'ajout de roténone.

Régime riche en fructose et production de ROS par les mitochondries de muscle squelettique

Le régime riche en fructose entraîne une augmentation de la production de ROS dans les mitochondries de muscle squelettique (figure 3-5), mais cette modification ne semble pas liée à une altération de la respiration mitochondriale ou de l'activité des différents complexes (tableau 4-6). Cependant, en comparant les rats FD avec les rats CHO, la quantité d'H₂O₂ produite en présence ou non d'inhibiteurs (roténone et antimycine A) est augmentée d'un même rapport (autour de 35-40%) quel que soit le substrat respiratoire. Ce profil pourrait correspondre à une inhibition des défenses antioxydantes d'autant qu'une diminution du statut antioxydant (GSH, SOD, GPx, catalase) est observée dans le foie de rats soumis à un régime riche en fructose mais est également dans d'autres tissus (cœur et sang) (*Armutcu et al, 2005 ; Busseroles et al, 2002b, Faure et al, 1997 ; Srividhya & Anuradha, 2002 ; Thirunavukkarasu & Anuradha, 2004*).

De plus, le muscle gastrocnémien rouge dont nous avons extrait les mitochondries est constitué de 30% de fibres de type I (muscle rapide, oxydatif), 62% de fibres de type IIa (muscle rapide, oxydatif-glycolytique) et 8% de fibres de type IIb (muscle lent, glycolytique) (*Armstrong & Phelps, 1984*). Or, il est observé, dans le muscle soléaire de rats soumis à un régime riche en fructose, une augmentation de la proportion des fibres de type II (+ 30%) au détriment des fibres de type I (- 10%) (*Higashiura et al, 1999*). Dans leur étude, Anderson & Neuffer (2005) rapportent que les fibres de type II produisent plus de ROS que les fibres de type I. Ainsi, un changement dans la typologie musculaire chez les rats FD en faveur d'une augmentation de la proportion de fibres de type II peut être envisagé et pourrait participer à l'augmentation de la production de ROS.

Toutefois, le régime riche en saccharose, dès qu'il est prolongé pendant 6 semaines, entraîne une diminution de la production de ROS dans les mitochondries de muscle oxydatif (soléaire) et glycolytique (tibialis) (*Chanseume et al, 2006*). Ces auteurs remarquent de même des modifications du fonctionnement mitochondrial caractéristiques à chacun des 2 muscles. Ils arrivent de ce fait à la conclusion que la consommation excessive de saccharose est associée à des adaptations mitochondriales spécifiques au type musculaire visant à réduire la production de ROS.

Traitement à la GliSODin® et production de ROS par les mitochondries de foie et de muscle squelettique

Chez les rats soumis au régime standard, la GliSODin® entraîne une diminution de la production de ROS par les mitochondries de foie et de muscle squelettique (figure 2-3). Comme décrit précédemment pour le muscle squelettique de rats FD, ce résultat ne peut s'expliquer par des modifications dans l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cependant, si nous comparons les rats CHO-SOD avec les rats CHO, la quantité d'H₂O₂ produite est diminuée de manière équivalente pour tout substrat respiratoire, avec ou sans inhibiteurs. Cette diminution atteint 30 à 45% dans le foie et 50% dans le muscle squelettique. Ce profil pourrait donc répondre à une stimulation des défenses antioxydantes, une hypothèse qui est d'ailleurs renforcée par les résultats de Vouldoukis *et al* (2004b). En effet, chez des souris traitées à la GliSODin (1mg/jour/souris), l'activité de la SOD est augmentée de 80% dans le sang dès 14 jours de traitement et elle est multipliée par 4 dans le foie au bout de 21 jours. Après 28 jours de supplémentation avec ce complément alimentaire, la GPx et la catalase sont activées dans le sang et le foie.

Chez les rats FD-SOD, la GliSODin® entraîne également une diminution de la quantité d'H₂O₂ produite par les mitochondries de foie et de muscle squelettique quand celle-ci était augmentée par le régime riche en fructose (figure 2-3). La production de ROS chez les rats FD-SOD est désormais identique à celle des rats CHO-SOD. la GliSODin® réduit la production mitochondriale de ROS à un niveau basal indépendamment du régime alimentaire et de l'état des défenses antioxydantes.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Nous avons démontré que la production mitochondriale de ROS est globalement augmentée après 3 semaines de régime riche en fructose. Cependant, la quantité d'H₂O₂ générée par les mitochondries de foie est accrue uniquement lorsqu'elle est mesurée en présence de substrats fournissant du FADH₂. Ceci pourrait s'expliquer par la stimulation de l'activité du complexe II qui augmenterait le flux inverse d'électrons à travers le complexe I. Pour le muscle squelettique, l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale ne semble pas être impliquée dans l'augmentation de la production de ROS. En revanche, pour toutes les conditions expérimentales (substrat seul ou en présence d'inhibiteur des complexes I et III), la quantité d'H₂O₂ générée par les mitochondries de muscle squelettique des rats FD est 35 à 40% plus importante que celle des rats CHO. Ce profil pourrait être le reflet d'une inhibition des enzymes antioxydantes. Parallèlement à cela, la supplémentation à la GliSODin® réduit la production de ROS dans les 2 tissus, que les rats soient soumis au régime standard ou au régime riche en fructose. La quantité d'H₂O₂ générée chez les rats FD-SOD devient alors similaire à celle des rats CHO-SOD. L'effet de la GliSODin® semble être liée à une stimulation des défenses antioxydantes.

A partir de ces résultats, nous pouvons élargir nos investigations. En effet, les systèmes de défense antioxydante semblent avoir un rôle déterminant dans notre étude. Ceci pourrait être confirmé par les mesures d'activité des enzymes antioxydantes (SOD, GPx, catalase) mais aussi des contenus en GSH et vitamine E. De la même manière, les dégâts cellulaires induits par le régime riche en fructose seraient à considérer en évaluant notamment le degré de peroxydation lipidique, d'oxydation protéique et des dommages de l'ADN.

De plus, il est montré que la production de ROS peut être modulée par la composition lipidique et protéique des membranes mitochondriales (*Brand et al, 2003 ; Porter et al, 1996*). Ainsi, ce facteur n'est peut être pas à négliger, d'autant qu'il est observé une augmentation du contenu en acides gras monoinsaturés et une diminution des acides gras polyinsaturés dans différents tissus (*El Hafidi et al, 2001 ; Fukuchi et al, 2004*). Ceci pourrait suggérer une modification de leur incorporation dans les membranes.

Enfin, l'apport en vitamine E améliore les défenses antioxydantes mais aussi la résistance à l'insuline chez des rats soumis à un régime riche en fructose (*Faure et al, 1997*). Il serait donc intéressant de déterminer si de tels résultats sont obtenues avec la GliSODin®.

ETUDE III

Bien qu'elle soit utilisée dans le traitement de pathologies respiratoires, l'exposition à l'hyperoxie peut être à l'origine d'importantes séquelles. En effet, si l'oxygène est indispensable à la vie, il est aussi toxique (*Gerschmann et al, 1954 ; Crapo, 1986*). Cette toxicité se manifeste par une augmentation du stress oxydant, caractérisée par une production mitochondriale de ROS qui croît linéairement avec l'augmentation de la concentration d'O₂ (*Boveris & Chance, 1973 ; Freeman & Crapo, 1981 ; Turrens et al, 1982*) et par une diminution des défenses antioxydantes (*Muth et al, 2004 ; Bilzer & Gerbes, 2000 ; Lentsch et al, 2000*). Ainsi, l'espérance de vie des rats Sprague Dawley exposés à une hyperoxie sévère (98% d'O₂) est de 70 à 75h (*Clerch & Massaro, 1993 ; Frank, 1982 ; Frank et al, 1989*) et celle des rats Wistar de 60h (*résultats non publiés*). La tolérance à l'oxygène semble donc différente selon les souches au sein d'une même espèce. D'après la littérature, il est montré que deux méthodes permettent d'augmenter la survie de rats soumis à de fortes concentrations d'O₂ : le préconditionnement hyperoxique, qui consiste à exposer préalablement les rats à des hyperoxies modérées (*Clerch et al, 1998 ; Frank et al, 1989*), et la supplémentation en molécules antioxydantes (*Freeman et al, 1983 ; Turrens et al, 1985*).

Nous nous proposons donc de confronter ces deux approches. Le préconditionnement hyperoxique sur des rats Wistar a été déterminé de manière à obtenir un taux de survie de 100% après 60h d'hyperoxie sévère. A cette fin, nous avons appliqué le protocole suivant : 4 jours à 50% d'O₂ suivi de 4 jours à 80% d'O₂. L'antioxydant utilisé est la GliSODin[®] qui est un complément alimentaire constitué de SOD de melon et de gliadine de blé. Le traitement est effectué pendant 3 semaines à raison de 350mg/jour/rat de GliSODin[®].

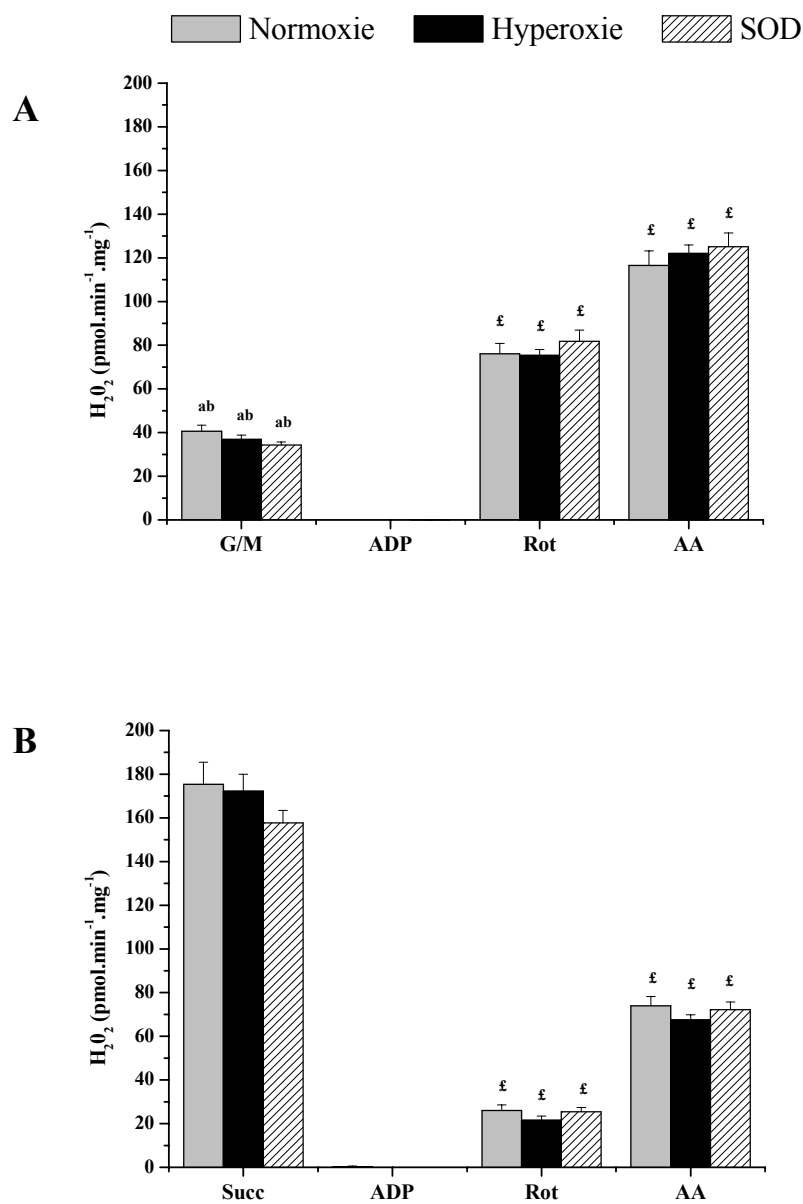
Nous avons déterminé la production mitochondriale de ROS ainsi que différents paramètres du stress oxydant : dégâts cellulaires (peroxydation lipidique, oxydation des protéines), les systèmes antioxydants non enzymatique (GSH) et enzymatique (SOD, GPx, catalase). Ces mesures ont été effectuées dans le foie. En effet, il semble que des altérations dans le fonctionnement hépatique puissent avoir des conséquences directes sur les dommages pulmonaires (*Colletti et al, 1995 ; Moorthy et al, 1997 ; Okaya et al, 2004*).

3 groupes de rats Wistar sont donc constitués : 1°) un groupe de rats soumis au protocole de préconditionnement soit : 4 jours à 50% d'O₂ suivi de 4 jours à 80% d'O₂ (Hyperoxie), 2°) un groupe de rats traités à la GliSODin[®] pendant 3 semaines à raison de 350mg/jour/rat (SOD),

et 3°) un groupe de rat "contrôle" : non soumis au préconditionnement hyperoxique et non traités à la GliSODin® (Normoxie).

RESULTATS

Production d'H₂O₂ mitochondriale



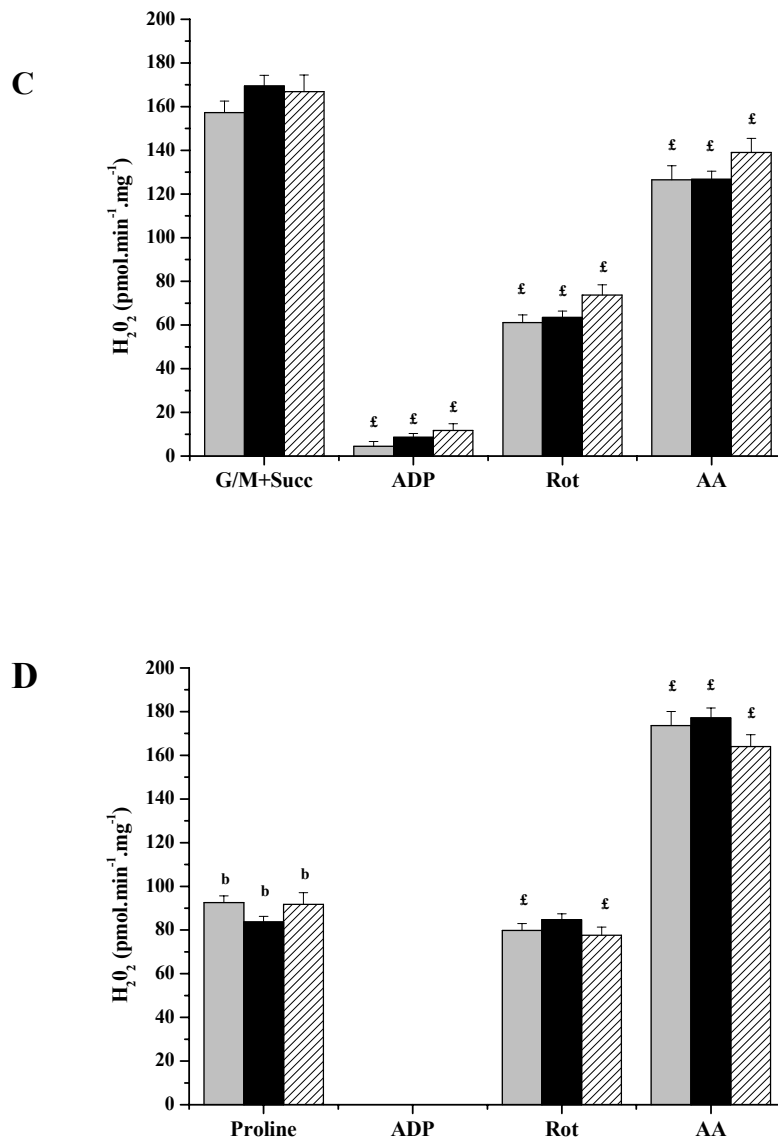


Figure 1 : Production d'H₂O₂ par les mitochondries de foie de rats normoxiques, hyperoxiques ou traités à la GliSODin®. Production d'H₂O₂ en présence de différents substrats respiratoires : **A.** glutamate/malate, **B.** succinate, **C.** glutamate/malate + succinate, **D.** proline.

£ : significativement différent du substrat seul (dans un même groupe de rat)

a : différence significative entre substrat fournissant du NADH,H⁺ ou du FADH₂ (succinate vs glutamate/malate)

b : significativement différent de glutamate/malate + succinate

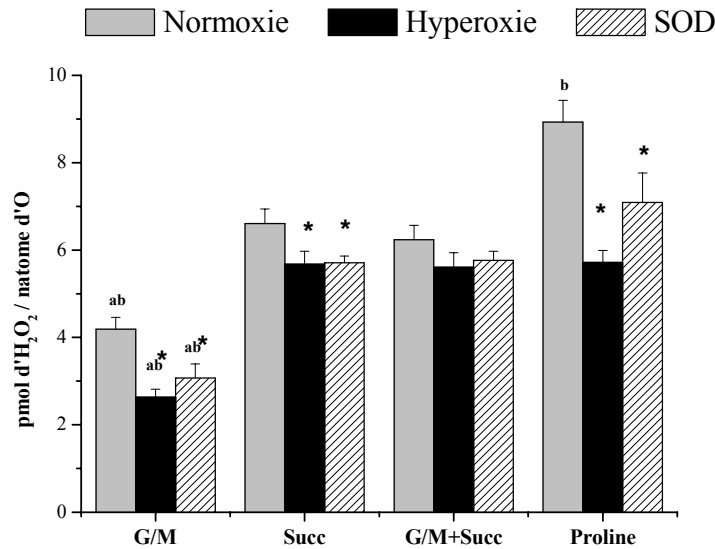


Figure 2 : Production d'H₂O₂ par natome d'oxygène consommé (à l'état 2) par les mitochondries de foie de rats normoxiques, hyperoxiques ou traités à la GliSODin®.

* : significativement différent des rats Normoxie

£ : significativement différent du substrat seul

a : différence significative entre substrat fournissant du NADH, H⁺ ou du FADH₂ (succinate vs glutamate/malate)

b : significativement différent de glutamate/malate + succinate

Effets du substrat sur la production mitochondriale d'H₂O₂

A l'état 2 (substrat seul), la production de ROS est dépendante du substrat fourni aux mitochondries (figure 1). Ainsi, la quantité d'H₂O₂ générée à partir du complexe I (glutamate/malate fournissant du NADH, H⁺, figure 1A) est 4 fois plus faible de celle produite à partir du complexe II (succinate fournissant du FADH₂, figure 1B). Par contre, lorsque les mitochondries sont énergisées simultanément au niveau des deux complexes respiratoires, deux profils se dessinent selon que la production de ROS est mesurée en présence de glutamate/malate + succinate (G/M/S) ou de proline (substrat fournissant du NADH, H⁺ et FADH₂ avec un rapport 1:1). En effet, si la quantité d'H₂O₂ produite en G/M/S est comparable à celle évaluée en succinate seul, elle s'élève de 40% par rapport à celle mesurée en proline. Toutefois, en rapportant ces valeurs à la quantité d'oxygène consommée: 1°) chez les rats normoxiques, la production de ROS devient supérieure en présence de proline qu'en présence de G/M/S et 2°) chez les rats hyperoxiques ou traités à la GliSODin®, plus aucune différence significative entre ces 2 substrats n'est perceptible (figure 2).

En condition de respiration active (ADP, état 3), la production de ROS est abolie exceptée en glutamate/malate + succinate.

En présence de glutamate/malate, l'augmentation de la quantité d' H_2O_2 produite, après l'ajout successif des inhibiteurs roténone et antimycine A, confirme que les sites de production de ROS sont les complexes I et III (figure 1A). La diminution significative de la production d' H_2O_2 lorsque les mitochondries sont incubées en présence de succinate et de roténone souligne à nouveau l'existence du flux inverse d'électrons (figure 1B). Nous retrouvons l'effet de la roténone en présence des substrats fournissant simultanément du NADH, H^+ et du FADH_2 bien qu'avec la proline son action soit quasi inexistante (figure 1C et D). Par contre, avec la proline, l'ajout d'antimycine A multiplie par 2 la production de ROS.

Effets du protocole de préconditionnement hyperoxique et du traitement à la GliSODin[®] sur la production mitochondriale d' H_2O_2

Le protocole de préconditionnement hyperoxique ainsi que le traitement à la GliSODin[®] n'affectent pas la production de ROS, sauf si la quantité d' H_2O_2 est ramenée à la consommation d'oxygène (figure 2). La production de ROS est alors diminuée de 25 à 35% selon le substrat respiratoire, dans le groupe Hyperoxie comme dans celui des SOD comparativement au groupe contrôle (Normoxie).

Consommation d'oxygène mitochondriale

		Normoxie	Hyperoxie	SOD
GLUT/MAL	<i>Etat 4</i>	8.6 ± 0.5 ^{ab}	10.6 ± 0.5* ^{ab}	9.6 ± 1.4 ^{ab}
	<i>Etat 3</i>	130 ± 5 ^{ab}	151 ± 6* ^{ab}	145 ± 7 ^{ab}
	<i>RCR</i>	15.5 ± 0.7 ^{ab}	14.3 ± 0.5 ^{ab}	21.6 ± 5.3 ^{ab}
SUCCINATE	<i>Etat 4</i>	17.5 ± 0.7	19.4 ± 1.1 ^b	20.9 ± 1.8 ^b
	<i>Etat 3</i>	175 ± 4 ^b	193 ± 5*	194 ± 7*
	<i>RCR</i>	10.1 ± 0.3 ^b	10.5 ± 0.4	10.4 ± 1.4
SUCCINATE+ROT	<i>Etat 4</i>	16.4 ± 0.6 ^b	18.7 ± 1.1 ^b	18.8 ± 1.0 ^b
	<i>Etat 3</i>	171 ± 6	186 ± 5 ^b	189 ± 5*
	<i>RCR</i>	9.4 ± 1.0	10.1 ± 0.5	10.3 ± 0.6
GLUT/MAL+SUC	<i>Etat 4</i>	18.6 ± 0.8	22.1 ± 1.6	23.1 ± 1.8*
	<i>Etat 3</i>	167 ± 4	194 ± 6**	200 ± 9**
	<i>RCR</i>	9.2 ± 0.2	9.4 ± 0.5	9.0 ± 0.6
PROLINE	<i>Etat 4</i>	9.9 ± 0.3 ^b	11.2 ± 0.8 ^b	11.3 ± 1.2 ^b
	<i>Etat 3</i>	67 ± 2 ^b	81 ± 3** ^b	81 ± 4** ^b
	<i>RCR</i>	6.8 ± 0.2 ^b	7.4 ± 0.4 ^b	7.0 ± 0.5 ^b
TMPD		130 ± 6	156 ± 8*	152 ± 6*
DNP		169 ± 4	214 ± 6*	220 ± 7**

Tableau 1 : Consommation d'oxygène (natome d'O.min⁻¹.mg⁻¹) par les mitochondries de foie de rats normoxiques, hyperoxiques ou traités à la GliSODin®.

* : significativement différent de Normoxie, *p<0,05 ; **p<0,01

a : différence significative entre substrat fournissant du NADH,H⁺ ou du FADH₂ (succinate vs glutamate/malate)

b : significativement différent de glutamate/malate + succinate

Effets du substrat sur la respiration mitochondriale

Lorsque les mitochondries de foie respirent avec du succinate, la présence ou non de roténone ne modifie en rien la consommation d'oxygène. Par contre, la respiration mitochondriale est dépendante du substrat fourni. Ainsi, les respirations basales (oligomycine, état 4) et active (ADP, état 3) en présence de glutamate/malate (NADH,H⁺) sont plus faibles que celles en présence de succinate (FADH₂). Lorsque les mitochondries sont stimulées simultanément au niveau des deux complexes, la consommation d'O₂ en présence de glutamate/malate + succinate est similaire à celle en présence de succinate seul alors qu'avec la proline, elle est au moins 2 fois plus faible.

Effets du protocole de préconditionnement hyperoxique et du traitement à la GliSODin® sur la respiration mitochondriale

Le protocole de préconditionnement hyperoxique entraîne une augmentation de 10% à 15% de la respiration en condition d'oxydation phosphorylante et ce, pour tous les substrats. Ceci suggère une augmentation de l'activité du complexe IV qui semble être confirmée par une consommation en oxygène plus élevée en présence de TMPD ou de DNP chez les rats hyperoxiques comparativement aux rats normoxiques.

Le traitement à la GliSODin® procure les mêmes effets que le préconditionnement hyperoxique avec une augmentation de 10% à 15% de la respiration à l'état 3, de 15% en TMPD et de 25% en DNP.

Activités enzymatiques et cytochromes de la chaîne respiratoire

	Normoxie	Hyperoxie	SOD
Complex I (nmol/min/mg protéine)	76 ± 5	77 ± 6	80 ± 4
Complex II (nmol/min/mg protéine)	277 ± 9	293 ± 13	304 ± 9
Complex IV (nmol/min/mg protéine)	843 ± 42	1094 ± 53**	1043 ± 39**
Citrate Synthase (nmol/min/mg protéine)	267 ± 11	282 ± 10	282 ± 15
CI/CS	0.29 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.29 ± 0.02
CII/CS	1.05 ± 0.05	1.02 ± 0.02	1.06 ± 0.06
CIV/CS	3.20 ± 0.18	3.99 ± 0.09**	3.74 ± 0.15*
Cytochrome aa₃ (pmol/mg protéine)	147 ± 10	158 ± 17	151 ± 12
Cytochrome c (pmol/mg protéine)	154 ± 7	156 ± 6	131 ± 10* [#]
Cytochrome c₁ (pmol/mg protéine)	128 ± 10	149 ± 13	166 ± 11
Cytochrome b (pmol/mg protéine)	202 ± 12	217 ± 4	220 ± 9

Tableau 2 : Activités enzymatiques et cytochrome de la chaîne respiratoire mitochondriale de foie de rats normoxiques, hyperoxiques ou traités à la GliSODin®.

* : significativement différent de Normoxie

: significativement différent d'Hyperoxie

Comme attendu, le protocole de préconditionnement hyperoxique et le traitement à la GliSODin® entraînent une augmentation de l'activité du complexe IV, qu'elle soit exprimée en mg de protéine mitochondriale ou rapportée à l'activité de la citrate synthase. Le contenu en cytochrome aa3 n'est pas modifié. La quantité de cytochrome c est, elle, réduite chez les rats SOD comparativement aux rats normoxiques et hyperoxiques.

Paramètres du stress oxydant dans le foie

	Normoxie	Hyperoxie	SOD
TBARs ($\mu\text{mol/g prot}$)	0.17 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.01
Thiols ($\mu\text{mol/g prot}$)	57.3 ± 2.4	$51.3 \pm 2.8^*$	$60.9 \pm 1.2^\#$

Tableau 3 : Peroxydation lipidique (TBARS) et oxydation protéique (Thiols) dans le foie de rats normoxiques, hyperoxiques ou traités à la GliSODin®.

* : significativement différent de Normoxie, * $p < 0,05$

: significativement différent d'Hyperoxie, # $p < 0,05$

	Normoxie	Hyperoxie	SOD
Glutathion total ($\mu\text{mol/g foie}$)	8.2 ± 0.5	$7.2 \pm 0.3^*$	$9.1 \pm 0.3^\#$
GSH ($\mu\text{mol/g foie}$)	7.9 ± 0.3	$6.9 \pm 0.3^*$	$8.8 \pm 0.3^\#$
GSSG ($\mu\text{mol/g foie}$)	0.31 ± 0.02	$0.24 \pm 0.03^*$	$0.35 \pm 0.02^\#$
GSH/GSSG	26.2 ± 1.6	30.5 ± 2.5	24.3 ± 1.1

Tableau 4 : Glutathion total, oxydé (GSSG) et réduit (GSH) dans le foie de rats normoxiques, hyperoxiques ou traités à la GliSODin®.

* : significativement différent de Normoxie, * $p < 0,05$

: significativement différent d'Hyperoxie, # $p < 0,05$

La peroxydation lipique n'est pas affectée chez les rats soumis au protocole de préconditionnement hyperoxique ou traités à la GliSODin®. Par contre, la diminution des groupements thiols chez les rats hyperoxiques pourrait traduire une augmentation de l'oxydation protéique, reflet d'un stress oxydant accru dans le foie de ces rats (tableau 3). Cependant, le glutathion réduit (GSH) étant caractérisé par un groupement thiol, la diminution du contenu de ce dernier dans le foie des rats hyperoxiques peut simplement être du à la faible quantité de GSH mesurée chez ces animaux (tableau 4). Une réduction conjointe de 10% des thiols et du GSH chez les rats hyperoxiques comparativement aux rats normoxiques vient

étayer cette hypothèse. Parallèlement à cela, une même augmentation (15-20%) de ces deux paramètres est observée entre les rats SOD et les rats hyperoxiques. Les quantités de glutathion totale et oxydé sont également diminuées chez les rats hyperoxiques comparativement à celles mesurées chez les rats normoxiques sans toutefois altérer le rapport GSH/GSSG (tableau 4).

Activités d'enzymes antioxydantes dans le foie

	Normoxie	Hyperoxie	SOD
GPx (U/g prot)	2026 ± 136	2270 ± 61	2292 ± 130
Catalase (U/g prot)	626 ± 44	437 ± 28*	706 ± 37 [#]
SOD Totale (U/g prot)	20.9 ± 0.5	20.6 ± 0.9	20.7 ± 0.8
SOD CuZn (U/g prot)	18.0 ± 0.6	17.5 ± 0.9	17.8 ± 0.8
SOD Mn (U/g prot)	2.6 ± 0.2	3.0 ± 0.3	2.7 ± 0.2

Tableau 5 : Activités de la glutathion peroxydase (GPx), de la catalase et de la superoxyde dismutase totale (SOD totale), cytosolique (SOD CuZn) et mitochondriale (SOD Mn) dans le foie de rats normoxiques, hyperoxiques ou traités à la GliSODin®.

* : significativement différent de Normoxie, *p<0,05

[#] : significativement différent d'Hyperoxie, [#] p<0,05

La catalase est la seule enzyme antioxydante dont l'activité est modifiée par le protocole de préconditionnement hyperoxique avec une diminution de l'ordre de 30% par rapport aux rats normoxiques.

Composition des membranes mitochondriales en acides gras et phospholipides

	Normoxie	Hyperoxie	SOD
C14:0	0.36 ± 0.02	0.14 ± 0.01**	0.37 ± 0.02 ^{##}
C15:0	0.44 ± 0.04	0.17 ± 0.01**	0.24 ± 0.01**
C16:0	18.90 ± 0.21	17.17 ± 0.11**	19.31 ± 0.43 ^{##}
C18:0	15.32 ± 0.31	19.71 ± 0.45**	16.41 ± 0.43 ^{##}
acides gras saturés	35.29 ± 0.42	37.48 ± 0.25**	36.33 ± 0.18*[#]
C14:1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
C16:1w7	1.88 ± 0.19	0.87 ± 0.08**	2.18 ± 0.25 ^{##}
C16:1w9	0.175 ± 0.004	0.082 ± 0.006**	0.156 ± 0.006* ^{##}
C17:1	0.16 ± 0.02	0.00 ± 0.00**	0.04 ± 0.02**
C18:1w7	5.18 ± 0.22	3.27 ± 0.09**	4.77 ± 0.19 ^{##}
C18:1w9	4.39 ± 0.14	3.24 ± 0.15**	4.21 ± 0.16 ^{##}
C20:1w9	0.09 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.07 ± 0.03
acides gras monoinsaturés	11.89 ± 0.49	7.63 ± 0.35**	11.43 ± 0.48^{##}
C18:2w6	18.91 ± 0.30	19.05 ± 0.38	18.67 ± 0.27
C18:3w3	0.160 ± 0.009	0.157 ± 0.03	0.164 ± 0.07
C18:3w6	0.29 ± 0.01	0.20 ± 0.02**	0.25 ± 0.02 ^{##}
C20:2w6	0.48 ± 0.02	0.30 ± 0.02**	0.36 ± 0.04*
C20:3w6	1.13 ± 0.07	0.70 ± 0.04**	1.11 ± 0.05 ^{##}
C20:3w9	0.37 ± 0.02	0.18 ± 0.02**	0.40 ± 0.03 ^{##}
C20:4w6	21.84 ± 0.26	25.68 ± 0.26**	22.64 ± 0.24* ^{##}
C20:5w3	0.52 ± 0.04	0.39 ± 0.05**	0.58 ± 0.03 ^{##}
C22:4w6	0.29 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.01
C22:5w3	1.14 ± 0.06	0.80 ± 0.02**	0.84 ± 0.03**
C22:5w6	0.23 ± 0.04	0.07 ± 0.03*	0.09 ± 0.05*
C22:6w3	7.78 ± 0.24	7.36 ± 0.33	6.34 ± 0.16* ^{##}
acides gras polyinsaturés	53.32 ± 0.58	55.17 ± 0.14**	52.24 ± 0.55^{##}
acides gras insaturés	64.71 ± 0.42	62.52 ± 0.25**	63.67 ± 0.18*[#]
AGMI/AGPI	0.223 ± 0.010	0.133 ± 0.004**	0.220 ± 0.011^{##}
AGI/AGS	1.84 ± 0.03	1.67 ± 0.02**	1.75 ± 0.01*[#]
Σw6	43.14 ± 0.58	46.29 ± 0.29**	43.89 ± 0.57^{##}
Σw3	10.03 ± 0.19	8.71 ± 0.30**	7.87 ± 0.19*[#]
w6/w3	4.43 ± 0.15	5.37 ± 0.21**	5.61 ± 0.18**

Tableau 6 : Composition des membranes mitochondriales hépatiques en acides gras (exprimée en % d'acides gras totaux) de rats normoxiques, hyperoxiques ou traités à la GliSODin®. (AGS) : acides gras saturés, (AGI) : acides gras insaturés, (AGMI) : acides gras monoinsaturés, (AGPI) : acides gras polyinsaturés.

* : significativement différent de Normoxie, *p<0,05 ; **p<0,01

: significativement différent d'Hyperoxie, # p<0,05 ; , ## p<0,01

D'un autre coté, le protocole de préconditionnement hyperoxique et le traitement à la GliSODin® entraînent une modification de la répartition des acides gras dans les membranes mitochondriales de foie. Ainsi, le contenu en acides gras saturés est augmenté et celui en acides gras insaturés diminué, ceci ayant pour conséquence une diminution du rapport AGI/AGS de 10% chez les Hyperoxiques et de 5% chez les SOD comparativement aux rats nomoxiques. Nous pouvons également souligner que, chez les rats hyperoxiques, le contenu

en acide γ -linolénique (C18:3w6) baisse tandis que celui en acide arachidonique (C20:4w6) s'accroît. Or, l'acide γ -linolénique est un précurseur de ce dernier. Sa diminution pourrait donc être la conséquence d'une augmentation de la Δ -5 désaturase permettant une plus grande synthèse d'acide arachidonique.

Le protocole de préconditionnement hyperoxique et le traitement à la GliSODin® provoquent également une augmentation du rapport w6/w3 d'environ 20% comparativement à celui des Normoxies. Chez les rats hyperoxiques, le rapport AGMI/AGPI est plus faible que celui des rats normoxiques et SOD.

	Normoxie	Hyperoxie	SOD
Cardiolipines	287 $\pm$ 6	297 $\pm$ 4	266 $\pm$ 5** ^{##}
PhosphatidylInositol	198 $\pm$ 10	197 $\pm$ 9	169 $\pm$ 5* [#]
PhosphatidylEthanolamine	758 $\pm$ 32	748 $\pm$ 10	685 $\pm$ 18
PhosphatidylCholine	1130 $\pm$ 44	1041 $\pm$ 21	1047 $\pm$ 44

Tableau 7 : Composition des membranes mitochondriales hépatiques en phospholipides (exprimé en....) de rats normoxiques, hyperoxiques ou traités à la GliSODin®.

* : significativement différent de Normoxie, *p<0,05 ; **p<0,01

: significativement différent d'Hyperoxie, # p<0,05 ; ^{##} p<0,01

Bien que la répartition en acides gras dans les membranes mitochondriales de foie soit altérée chez les rats hyperoxiques, la composition en phospholipides n'est pas différente de celle des rats normoxiques. Par contre, les contenus en cardiolipine et en phosphatidylInositol sont diminués chez les rats SOD.

DISCUSSION

Production de ROS par les mitochondries de foie

A ce jour, peu de travaux utilisent des substrats fournissant simultanément des équivalents réduits au niveau des complexes I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale. Dans notre étude, nous avons donc combiné le glutamate/malate au succinate (G/M/S) et utilisé de la proline afin d'alimenter la chaîne respiratoire, conjointement avec du NADH, H⁺ et du FADH₂. Cependant, la production de ROS dans ces deux conditions est différente. En effet, la quantité d'H₂O₂ générée lorsque les mitochondries sont incubées en présence de la proline est plus faible de 40% que celle produite en présence de G/M/S (figure 1 C et D). Cette tendance s'inverse si la quantité d'H₂O₂ est rapportée à la quantité d'oxygène consommée : chez les rats normoxiques cette production devient plus élevée en proline qu'en G/M/S alors que chez les rats hyperoxiques ou traités à la GliSODin® les niveaux de ROS atteints sont similaires (figure 2). D'autres différences persistent entre G/M/S et proline, notamment après l'ajout de roténone. En présence de G/M/S, cet inhibiteur du complexe I diminue la quantité d'H₂O₂ produite. Ce phénomène est également observé en présence de succinate seul (figure 1B), illustrant une production substantielle de ROS liée au flux inverse d'électrons à travers le complexe I. En présence de proline, la roténone n'exerce qu'un effet marginal sur la quantité d'H₂O₂ produite. Ceci suggère que le flux inverse d'électrons n'est pas la principale source de ROS avec ce substrat respiratoire. Par contre, la quantité d'H₂O₂ produite est multipliée par 2 après ajout d'antimycine A, témoignant d'un rôle déterminant du complexe III dans la production de ROS.

Effets de l'hyperoxie et production de ROS par les mitochondries de foie

Plusieurs études décrivent une relation inverse entre le rapport acides gras monoinsaturés / acides gras polyinsaturés (AGMI/AGPI) dans les membranes mitochondriales et la quantité d'H₂O₂ produite (Mataix et al, 1998 ; Molnar et al, 2006). Etant donné que ce rapport est plus faible chez les rats hyperoxiques que chez les rats normoxiques (tableau 6), leur production de ROS devrait être plus importante. Or, les quantités d'H₂O₂ produites par les mitochondries hépatiques sont identiques dans ces 2 groupes, et ce quel que

soit le substrat respiratoire (figure 1). Evelson & Gonzalez-Flecha (2000) obtiennent des résultats similaires dans le foie de rats exposés à une hyperoxie à 85% d'O₂ alors que la production de ROS est augmentée dans le poumon. Ils attribuent cette différence de comportement entre les 2 organes à un système antioxydant qui est plus important dans le foie, notamment au niveau de l'activité de la SOD. De plus, si nous rapportons le taux d'H₂O₂ produit à la quantité d'oxygène consommée, la production de ROS devient plus faible chez les Hyperoxiques que chez les Normoxiques (figure 2). Une augmentation des défenses antioxydantes pourrait être à l'origine de ce phénomène. Pour autant, aucune enzyme antioxydante n'est stimulée, l'activité de la catalase étant même diminuée (tableau 5).

En parallèle, le protocole de préconditionnement hyperoxique conduit à une augmentation de l'activité de la cytochrome c oxydase (COX) (tableau 1, tableau 2). Cette réponse est également obtenue au niveau de la rétine chez des rats soumis à une hyperoxie modérée (35% d'O₂) pendant 3 jours (Siskova & Wilhelm, 2001). Campian *et al* (2004) montrent de leur côté une étroite corrélation entre une augmentation de l'activité de la COX, une diminution de la production de ROS et une meilleure tolérance à l'oxygène. En comparant deux lignées de cellules (HeLa-80 vs HeLa-20) dont la seule différence réside en une activité de la COX qui est deux fois plus élevée chez les HeLa-80, les auteurs découvrent que ces dernières ont une production de ROS deux fois plus faible. Elles ont aussi une courbe de croissance en hyperoxie (80% d'O₂) comparable à celle observée en normoxie (20% d'O₂) alors que les cellules HeLa-20 voient leur taux de survie diminuer dès 5 jours d'hyperoxie. Ils ont également observé que l'inhibition de l'activité de la COX chez les HeLa-80 restaure leur sensibilité à l'oxygène. Certains auteurs associent également l'augmentation de la production de ROS lors de pathologies (Alzheimer, Encephalomyopathie) à la diminution de l'activité de la COX (Cardoso *et al*, 2004 ; Di Giovanni *et al*, 2001). La cytochrome c oxydase a ainsi été définie comme un système de défense antioxydante, notamment par sa capacité à diminuer la stoechiométrie H⁺/e⁻ (Capitanio *et al*, 1996 ; Papa *et al*, 1997a ; Papa *et al*, 1997b). En effet, l'augmentation du flux d'électrons, sans pour autant agir sur l'efflux de protons, permettrait une plus grande consommation d'O₂ par la mitochondrie afin de détoxifier la cellule. Par ailleurs, d'autres études dévoilent que l'activité de la COX est fonction de la concentration en oxygène présent dans le milieu, une augmentation de sa concentration induisant augmentation de l'activité de la COX (Wiedemann & Kunz, 1998 ; Gnaiger *et al*, 1998 ; Gnaiger & Kuznetsov, 2002). Elle fournit donc un dispositif permettant de baisser toute concentration excessive en O₂ intracellulaire et par conséquent de prévenir la formation de ROS. L'augmentation de l'activité de la COX est généralement associée à une augmentation de son

contenu en cytochromes aa3, et inversement (Nogueira et al, 2001 ; Piquet et al, 2000), mais ceci n'apparaît pas dans notre cas (tableau 2). Cette augmentation de l'activité de la COX pourrait donc être liée à une activité catalytique élevée et à une forte affinité pour l'oxygène (Papa et al, 1997), mais il faut également tenir compte de son environnement lipidique (Barzanti et al, 1994 ; Fontaine et al, 1996 ; Vazquez-Memije et al, 2005). Barzanti et al (1994) ont observé les effets d'une modification de la composition en acides gras dans les membranes de mitochondries de foie, cœur et cerveau de pigeons sur différentes enzymes clés du métabolisme. Il en ressort une certaine relation entre l'augmentation du degré d'insaturation, la diminution du rapport w6/w3 et la réduction de l'activité de la COX. Chez les rats hyperoxiques, nous obtenons exactement l'effet inverse avec une diminution du degré d'insaturation, une augmentation rapport w6/w3 et un accroissement de l'activité de la COX (tableau 1,2 et 6). De plus, une étude faite au sein de notre laboratoire (Martin et al, non publié) montre des analogies évidentes avec nos résultats. Ces auteurs observent en effet une augmentation de l'activité de la COX dans les mitochondries de muscle de rats âgés comparativement à celle de rats adultes, sans augmentation du contenu en cytochrome aa3 (son contenu est même diminué). Par contre, le rapport w6/w3 est augmenté alors que le degré d'insaturation ne semble pas être affecté. Ceci rejoint l'hypothèse émise par Araya et al (1991) stipulant que l'augmentation des acides gras w6 (ou éventuellement la baisse en w3) dans les membranes augmente l'activité de la cytochrome c oxydase. Chez nos rats soumis au protocole de préconditionnement hyperoxique, cette augmentation des acides gras w6 est principalement liée à une augmentation du contenu en acide arachidonique (ARA) (tableau 6). Or, cet acide gras est connu pour induire la synthèse d'eicosanoïdes pro-inflammatoires tel que les prostaglandines, les thromboxanes et les leucotriènes (Babcock et al, 2000 ; Calder, 2001 ; Henderson, 1994). L'augmentation du contenu en ARA pourrait s'expliquer par une activation de désaturases favorisant sa synthèse et par une augmentation de plasmalogènes. En effet, de nombreux phospholipides contenant une liaison vinyl éther en position *sn-1*, une caractéristique des plasmalogènes, possèdent aussi un ARA en position *sn-2* (Molnar et al, 2006). Différentes études montrent que les plasmalogènes ont une efficacité antioxydante en s'opposant à la propagation de la peroxydation lipidique (Engelmann, 2004 ; Nagan & Zoeller, 2001 ; Zoeller et al, 1999). De même, le faible degré d'insaturation des membranes mitochondriales des rats hyperoxiques pourrait participer à la protection de celles-ci contre le stress oxydant en diminuant également les risques de peroxydation lipidique (Pamplona et al, 1999 ; Hulbert, 2005).

En résumé, les modifications de la composition en acides gras des membranes mitochondriales de foie des rats hyperoxiques tendent à augmenter l'activité de la COX, ce qui permettrait de maintenir voire de diminuer la production de ROS.

Cependant, le protocole d'hyperoxie que nous avons élaboré entraîne également une diminution de la quantité de glutathion réduit (GSH), une diminution que certains auteurs attribuent spécifiquement au foie (*Malleske et al, 2006 ; Miralles et al, 2000b ; Rusakov et al, 1993*). Les mécanismes responsables de cette faible quantité de GSH hépatique ne semblent pas altérer les activités de la glutathion peroxydase (GPx) ou de la glutathion réductase (GR) (tableau 5 ; *Ban et al, 2002 ; Malleske et al, 2006 ; Moorthy et al, 1997*). Par contre, cet épuisement du taux de GSH serait une réponse physiologique en vue de maintenir son niveau dans les autres organes, notamment les poumons (*Lauterburg et al, 1984 ; Wong et al, 2001*). C'est une des raisons pour laquelle, il doit exister un lien direct entre le foie et les poumons lors d'une exposition à l'hyperoxie (*Moorthy et al, 1997*).

Effets de la GliSODin® et production de ROS par les mitochondries de foie

Le traitement à la GliSODin® n'entraîne aucune altération des paramètres pro-oxydants : absence de peroxydation lipidique, d'oxydation protéique et de diminution du rapport GSH/GSSG (tableau 3-4). Ce traitement favorise au contraire une diminution du stress oxydant avec une quantité d'H₂O₂ produite par quantité d'oxygène consommée qui est plus faible comparativement à celle des rats non traités (Normoxie) (figure 2). Mais cette diminution de la production de ROS n'est pas liée à une augmentation de l'activité d'enzymes antioxydantes (tableau 5). Il semble en effet que le traitement à la GliSODin® doit être prolongé avant que les défenses antioxydantes ne soient stimulées. Par exemple, chez l'homme, le traitement à la GliSODin® pendant 2 semaines ne modifie pas le statut antioxydant (Cu/Zn-SOD, catalase, Gpx, GSH dans le sang) (*Muth et al, 2004*). Cette supplémentation permet néanmoins une meilleure protection contre le stress oxydant induit par l'exposition en hyperbarie à travers une absence d'augmentation des dommages de l'ADN et de peroxydation lipidique. Par contre, chez la souris, 14 jours de traitement à la GliSODin® sont suffisants pour augmenter l'activité de la SOD circulante et 21 jours pour celle du foie. Après 28 jours de traitement, les activités de la GPx et de la catalase sont pareillement stimulées dans le sang et le foie (*Vouldoukis et al, 2004b*). La différence de résultats obtenus

en réponse à 2 semaines de supplémentation avec ce complément alimentaire est certainement lié aux modèles utilisés : homme vs souris. Ceci expliquerait également le manque d'augmentation des défenses antioxydantes chez le rat même après 3 semaines de traitement.

Comme pour le préconditionnement à l'hyperoxie, l'activité de la COX est augmentée chez les rats SOD comparativement aux rats normoxiques (tableau 2). Nous retrouvons également une diminution du degré d'insaturation dans les membranes mitochondriales et une augmentation du rapport w6/w3 liée à une augmentation du contenu en acide arachidonique (tableau 6). Si ce dernier induit une réaction pro-inflammatoire, la GliSODin[®], quant à elle, présente des propriétés anti-inflammatoires, notamment par sa capacité à induire la production d'IL-10 par les macrophages (*Vouldoukis et al, 2004a*).

Le système antioxydant mis en place chez les rats SOD ressemble donc à celui des rats hyperoxiques et passerait par la COX. La similitude entre ces deux groupes de rats est d'autant plus grande qu'une même activité de COX est obtenue avec une même production d'H₂O₂ (tableau 2, figure 1-2).

Cependant, les quantités de cardiolipines et de cytochrome c sont plus faibles chez les rats SOD que chez les rats normoxiques et hyperoxiques. Cette coexistence n'est pas surprenante car le contenu en cytochrome c est étroitement dépendant du contenu des membranes en cardiolipines (*Demel et al, 1989 ; Hoch, 1992 ; Nomura et al, 2000*). De telles modifications peuvent jouer sur la balance prooxydant/antioxydant ainsi que sur l'activité de la COX. La diminution du cytochrome c augmente en effet la production d'H₂O₂ pour autant que les mitochondries soient incubées en présence de substrats fournissant du NADH,H⁺ (*Chen & Lesnefsky, 2006 ; Kushnareva et al, 2002*), cette production n'étant effectivement pas altérée par les substrats fournissant du FADH₂. (*Chen & Lesnefsky, 2006 ; Kushnareva et al, 2002 ; Turrens et al, 1985*). De plus, une diminution du contenu en cardiolipine semble entraîner une diminution de l'activité du complexe IV (*Hoch, 1992 ; Lesnefsky et al, 2004 ; Paradies et al, 2000 ; Robinson et al, 1990*). Cela étant, il faut rappeler que, d'une part, la production de ROS chez les rats SOD est plus faible que celle des rats normoxiques, même en présence de substrat fournissant du NADH,H⁺ (glutamate/malate, figure 1A). D'autre part, le contenu en cytochrome aa3 est identique dans les deux groupes (tableau 2). Par conséquent, la diminution des cardiolipines et du cytochrome c rapportée dans notre étude ne semble pas interagir avec ces différents paramètres.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Les résultats de cette étude montrent que le protocole de preconditionnement hyperoxique (4 jours à 50% d'O₂ suivi de 4 jours à 80% d'O₂) tout comme les 3 semaines de traitement à la GliSODin[®] réduisent la quantité d'H₂O₂ générée par les mitochondries de foie de rats Wistar (lorsque celle-ci est rapportée à la quantité d'O₂ consommée). Le processus mis en place afin d'obtenir cette diminution paraît similaire dans les deux groupes expérimentaux. Les enzymes antioxydantes n'étant pas stimulées, ce mécanisme passerait par une augmentation de l'activité de la cytochrome c oxydase qui est connue pour avoir un pouvoir antioxydant intrinsèque. Dans notre étude, l'augmentation de l'activité de la cytochrome c oxydase semble être liée à une modification de la composition lipidique des membranes mitochondriales, plus précisément à une diminution du degré d'insaturation et/ou à une augmentation du rapport w6/w3. De plus, comme cela a été décrit dans la littérature, nous retrouvons une diminution du contenu en GSH dans le foie qui pourrait être dû à sa libération vers d'autres organes afin d'y maintenir une certaine concentration de glutathion et ainsi conserver une certaine capacité de défense antioxydante.

A partir de ces résultats, différentes perspectives sont envisageables. En effet, il a été montré que l'augmentation de l'activité de la cytochrome c oxydase est corrélée à une perte du rendement de la phosphorylation oxydative (*Nogueira et al, 2001*). Ainsi la mesure du rapport JATP/JO₂ pourrait être envisagée afin de compléter notre étude.

De plus, nous avons émis l'hypothèse que la stimulation de l'activité de la cytochrome c oxydase serait due à une augmentation du rapport w6/w3. L'acide arachidonique (C22:4w6) est un acide gras qui semble avoir un rôle déterminant dans l'augmentation de ce rapport car seul son contenu est accrue dans les deux groupes expérimentaux. Or, cet acide gras intervient dans les mécanismes pro-inflammatoires (*Babcock et al, 2000 ; Calder, 2001 ; Henderson, 1994*). Parallèlement à cela, la GliSODin[®] active certains facteurs anti-inflammatoires (*Vouldoukis et al, 2004a*). Il paraît donc intéressant d'évaluer le statut inflammatoire des rats soumis au protocole de preconditionnement hyperoxique et de ceux traités avec le complément alimentaire. Cependant, l'augmentation du contenu en acides arachidoniques peut être due à une augmentation en plasmalogène, un phospholipide ayant un pouvoir antioxydant (*Engelmann, 2004 ; Molnar et al, 2006 ; Nagan & Zoeller, 2001*). Le dosage des

phospholipides effectué seulement en partie pourrait donc être élargi afin d'obtenir des informations mécanistiques complémentaires.

Il serait aussi essentiel de déterminer si d'autres paramètres que la composition lipidique des membranes influencent l'activité de la cytochrome c oxydase. Par exemple, si le contenu en UCP2 est augmenté, ceci pourraient entraîner un léger découplage et participerait ainsi à l'augmentation de l'activité de la cytochrome c oxydase.

Enfin, 2 groupes expérimentaux pourrait compléter cette étude : 1°) un groupe de rats exposés au préconditionnement hyperoxique suivi d'une hyperoxie sévère, et 2°) un groupe de rats traités à la GliSODin[®] suivi également d'une hyperoxie sévère. Ceci permettrait de confirmer que ces différents protocoles augmentent effectivement la longévité des rats Wistar soumis à une hyperoxie sévère, sachant que leur survie est limitée à 60h sous O₂ à 98%.

CONCLUSION GENERALE

Cette étude, à partir de différents modèles expérimentaux (rats Lou/C et Wistar, régimes riches en lipides et en fructose, hyperoxie, mitochondries de foie et de muscle squelettique), a permis de confirmer l'influence de la nature des équivalents réduits, de l'apport en oxygène et de la supplémentation en antioxydant sur la production mitochondriale de ROS.

Nous avons pu mettre en évidence que la faible production de ROS conjointement à l'inhibition de l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) dans les mitochondries de muscle squelettique des rats Lou/C pourraient participer à l'augmentation de la durée de vie observée chez cette souche ; une souche qui est issue du rat Wistar et qui présente une prise alimentaire spontanément réduite. Cependant, lorsque ces rats sont soumis à un régime riche en lipides, la production d'H₂O₂ est restaurée et l'inhibition du PTP levée de sorte que les valeurs obtenues deviennent similaires à celles des rats Wistar. Ceci suggère que la protection contre le stress oxydant induite par de faibles apports caloriques est perdue lorsque la proportion de lipides dans le régime est élevée.

En outre, le régime riche en fructose entraîne une augmentation de la production de ROS dont le mécanisme semble dépendant du tissu. L'importante quantité d'H₂O₂ générée par les mitochondries de foie semble en effet liée à une augmentation du flux inverse d'électrons à travers le complexe I, alors que dans le muscle squelettique, une défaillance des défenses antioxydantes serait à l'origine du stress oxydant. Néanmoins, ce dernier peut être prévenue par une supplémentation en GliSODin[®] de manière à réduire la production de ROS jusqu'à un niveau basal et ceci quel que soit le régime alimentaire et l'état des défenses antioxydantes.

Enfin, si l'hyperoxie sévère (O₂>92%) augmente le stress oxydant, celui-ci est diminué par le préconditionnement hyperoxique que nous avons effectué (4 jours à 50% d'O₂ suivi de 4 jours à 80% d'O₂). La diminution de la production de ROS semble passer par l'augmentation de l'activité de la cytochrome c oxydase (COX) qui est connue pour avoir un pouvoir antioxydant intrinsèque. La stimulation de la COX n'est pas due à une augmentation de son contenu protéique (cytochrome aa3) mais serait la conséquence d'une modification de la composition des membranes mitochondriales, à savoir une diminution du degré d'insaturation et/ou une augmentation du rapport w6/w3.

Par ailleurs, les effets antioxydants de la GliSODin® semblent se mettre en place progressivement :

- après 3 semaines de traitement, nous observons une augmentation transitoire de l'activité de la COX (effet exactement similaire à celui du préconditionnement hyperoxique).
- après 5 semaines de traitement, cette augmentation de l'activité de la COX n'apparaît plus mais une stimulation de l'activité des enzymatiques antioxydantes pourrait probablement être à l'origine de l'effet bénéfique de la GliSODin®.

Ce travail a été subventionné par Isocell.

BIBLIOGRAPHIE

-A-

Abdoulaye D, Wetzler S, Goubert M, Helies JM, Fromentin G, Tome D and Larue-Achagiotis C (2006) Comparison of energy balance in two inbred strains of rats: Fischer F344 prone to obesity and Lou rats resistant to obesity. *Physiol Behav* 87, 245-250.

Akerboom TP and Sies H (1981) Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 77, 373-382.

Aliciguzel Y, Ozen I, Aslan M and Karayalcin U (2003) Activities of xanthine oxidoreductase and antioxidant enzymes in different tissues of diabetic rats. *J Lab Clin Med* 142, 172-177.

Alliot J, Boghossian S, Jourdan D, Veyrat-Durebex C, Pickering G, Meynial-Denis D and Gaumet N (2002) The LOU/c/jall rat as an animal model of healthy aging? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57, B312-320.

Ames BN, Shigenaga MK and Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7915-7922.

Ammon HP, Klumpp S, Fuss A, Verspohl EJ, Jaeschke H, Wendel A and Muller P (1989) A possible role of plasma glutathione in glucose-mediated insulin secretion: in vitro and in vivo studies in rats. *Diabetologia* 32, 797-800.

Anderson EJ and Neuffer PD (2006) Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H₂O₂ generation. *Am J Physiol Cell Physiol* 290, C844-851.

Andersson A, Nalsen C, Tengblad S and Vessby B (2002) Fatty acid composition of skeletal muscle reflects dietary fat composition in humans. *Am J Clin Nutr* 76, 1222-1229.

Araya J, Aguilera AM and Bosco C (1991) [The effect of dietary Omega 6 polyunsaturated fatty acids on the activity of enzymes associated with liver mitochondrial and placental function in rats]. *Arch Latinoam Nutr* 41, 62-71.

Ardawi MS, Majzoub MF, Masoud IM and Newsholme EA (1989) Enzymic and metabolic adaptations in the gastrocnemius, plantaris and soleus muscles of hypocaloric rats. *Biochem J* 261, 219-225.

Armstrong RB and Phelps RO (1984) Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am J Anat* 171, 259-272.

Armutcu F, Coskun O, Gurel A, Kanter M, Can M, Ucar F and Unalacak M (2005) Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats. *Clin Biochem* 38, 540-547.

Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, Couplan E, Alves-Guerra MC, Goubert M, Surwit R, Bouillaud F, Richard D, Collins S and Ricquier D (2000) Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet* 26, 435-439.

-B-

Babcock T, Helton WS and Espot NJ (2000) Eicosapentaenoic acid (EPA): an antiinflammatory omega-3 fat with potential clinical applications. *Nutrition* 16, 1116-1118.

Babior BM (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood* 93, 1464-1476.

Bakker SJ, RG IJ, Teerlink T, Westerhoff HV, Gans RO and Heine RJ (2000) Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and beta-cell failure? *Atherosclerosis* 148, 17-21.

Balaban RS, Nemoto S and Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483-495.

Ban R, Takitani K, Kim HS, Murata T, Morinobu T, Ogihara T and Tamai H (2002) alpha-Tocopherol transfer protein expression in rat liver exposed to hyperoxia. *Free Radic Res* 36, 933-938.

Banday AA, Marwaha A, Tallam LS and Lokhandwala MF (2005) Tempol reduces oxidative stress, improves insulin sensitivity, decreases renal dopamine D1 receptor hyperphosphorylation, and restores D1 receptor-G-protein coupling and function in obese Zucker rats. *Diabetes* 54, 2219-2226.

Barazzoni R, Zanetti M, Bosutti A, Biolo G, Vitali-Serdoz L, Stebel M and Guarnieri G (2005) Moderate caloric restriction, but not physiological hyperleptinemia per se, enhances mitochondrial oxidative capacity in rat liver

- and skeletal muscle--tissue-specific impact on tissue triglyceride content and AKT activation. *Endocrinology* 146, 2098-2106.
- Barja G (1999) Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr* 31, 347-366.
- Barja G (2002) The quantitative measurement of H₂O₂ generation in isolated mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 34, 227-233.
- Bartness TJ, Polk DR, McGriff WR, Youngstrom TG and DiGirolamo M (1992) Reversal of high-fat diet-induced obesity in female rats. *Am J Physiol* 263, R790-797.
- Barzanti V, Battino M, Baracca A, Cavazzoni M, Cocchi M, Noble R, Maranesi M, Turchetto E and Lenaz G (1994) The effect of dietary lipid changes on the fatty acid composition and function of liver, heart and brain mitochondria in the rat at different ages. *Br J Nutr* 71, 193-202.
- Batandier C, Leverve X and Fontaine E (2004) Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 279, 17197-17204.
- Batandier C, Guigas B, Detaille D, El-Mir MY, Fontaine E, Rigoulet M and Leverve XM (2006) The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin. *J Bioenerg Biomembr* 38, 33-42.
- Beckman KB and Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78, 547-581.
- Beckmann JD and Frerman FE (1985) Electron-transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase from pig liver: purification and molecular, redox, and catalytic properties. *Biochemistry* 24, 3913-3921.
- Bell RC, Carlson JC, Storr KC, Herbert K and Sivak J (2000) High-fructose feeding of streptozotocin-diabetic rats is associated with increased cataract formation and increased oxidative stress in the kidney. *Br J Nutr* 84, 575-582.
- Bender AE, Damji KB and Yapa CG (1970) Short communication. Effects of dietary sucrose on the metabolism in vitro of liver from rats of different strains. *Biochem J* 119, 351-352.
- Berger TM, Frei B, Rifai N, Avery ME, Suh J, Yoder BA and Coalson JJ (1998) Early high dose antioxidant vitamins do not prevent bronchopulmonary dysplasia in premature baboons exposed to prolonged hyperoxia: a pilot study. *Pediatr Res* 43, 719-726.
- Bernardi P (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79, 1127-1155.
- Bernardi P, Colonna R, Costantini P, Eriksson O, Fontaine E, Ichas F, Massari S, Nicolli A and Scorrano L (1998) The mitochondrial permeability transition. *Biofactors* 8, 273-281.
- Berti L, Mosthaf L, Kroder G, Kellerer M, Tippmer S, Mushack J, Seffer E, Seedorf K and Haring H (1994) Glucose-induced translocation of protein kinase C isoforms in rat-1 fibroblasts is paralleled by inhibition of the insulin receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 269, 3381-3386.
- Bevilacqua L, Ramsey JJ, Hagopian K, Weindruch R and Harper ME (2004) Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E852-861.
- Bevilacqua L, Ramsey JJ, Hagopian K, Weindruch R and Harper ME (2005) Long-term caloric restriction increases UCP3 content but decreases proton leak and reactive oxygen species production in rat skeletal muscle mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E429-438.
- Bilzer M and Gerbes AL (2000) Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J Hepatol* 32, 508-515.
- Bizeau ME, Thresher JS and Pagliassotti MJ (2001a) A high-sucrose diet increases gluconeogenic capacity in isolated periportal and perivenous rat hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E695-702.
- Bizeau ME, Short C, Thresher JS, Commerford SR, Willis WT and Pagliassotti MJ (2001b) Increased pyruvate flux capacities account for diet-induced increases in gluconeogenesis in vitro. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281, R427-433.
- Bligh EG and Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.

- Boghossian S, Veyrat-Durebex C and Alliot J (2000) Age-related changes in adaptive macronutrient intake in swimming male and female Lou rats. *Physiol Behav* 69, 231-238.
- Bonnefont-Rousselot D (2002) Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5, 561-568.
- Boss O, Hagen T and Lowell BB (2000) Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes* 49, 143-156.
- Boveris A and Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134, 707-716.
- Boveris A, Oshino N and Chance B (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128, 617-630.
- Brand MD (2000) Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp Gerontol* 35, 811-820.
- Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL and Parker N (2004) Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med* 37, 755-767.
- Brand DM, Turner N, Ocloo A, Else PL and Hulbert AJ (2003) Proton conductance and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. *Biochem J* 376, 741-748.
- Briet F and Jeejeebhoy KN (2001) Effect of hypoenergetic feeding and refeeding on muscle and mononuclear cell activities of mitochondrial complexes I-IV in enterally fed rats. *Am J Clin Nutr* 73, 975-983.
- Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813-820.
- Brownlee M (2005) The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615-1625.
- Brownlee M and Cerami A (1981) The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Biochem* 50, 385-432.
- Brun S, Carmona MC, Mampel T, Vinas O, Giralt M, Iglesias R and Villarroya F (1999) Uncoupling protein-3 gene expression in skeletal muscle during development is regulated by nutritional factors that alter circulating non-esterified fatty acids. *FEBS Lett* 453, 205-209.
- Busserolles J, Mazur A, Gueux E, Rock E and Rayssiguier Y (2002a) Metabolic syndrome in the rat: females are protected against the pro-oxidant effect of a high sucrose diet. *Exp Biol Med (Maywood)* 227, 837-842.
- Busserolles J, Zimowska W, Rock E, Rayssiguier Y and Mazur A (2002b) Rats fed a high sucrose diet have altered heart antioxidant enzyme activity and gene expression. *Life Sci* 71, 1303-1312.
- Busserolles J, Rock E, Gueux E, Mazur A, Grolier P and Rayssiguier Y (2002c) Short-term consumption of a high-sucrose diet has a pro-oxidant effect in rats. *Br J Nutr* 87, 337-342.
- Busserolles J, Gueux E, Rock E, Demigne C, Mazur A and Rayssiguier Y (2003) Oligofructose protects against the hypertriglyceridemic and pro-oxidative effects of a high fructose diet in rats. *J Nutr* 133, 1903-1908.

-C-

- Cadenas E, Boveris A, Ragan CI and Stoppani AO (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 180, 248-257.
- Cadenas S, Buckingham JA, Samec S, Seydoux J, Din N, Dulloo AG and Brand MD (1999) UCP2 and UCP3 rise in starved rat skeletal muscle but mitochondrial proton conductance is unchanged. *FEBS Lett* 462, 257-260.
- Calder PC (2001) Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids* 36, 1007-1024.
- Campion JL, Qian M, Gao X and Eaton JW (2004) Oxygen tolerance and coupling of mitochondrial electron transport. *J Biol Chem* 279, 46580-46587.
- Cann RL and Wilson AC (1983) Length mutations in human mitochondrial DNA. *Genetics* 104, 699-711.

- Capitanio N, Capitanio G, Demarinis DA, De Nitto E, Massari S and Papa S (1996) Factors affecting the H⁺/e⁻ stoichiometry in mitochondrial cytochrome c oxidase: influence of the rate of electron flow and transmembrane delta pH. *Biochemistry* 35, 10800-10806.
- Cardoso SM, Proenca MT, Santos S, Santana I and Oliveira CR (2004) Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets. *Neurobiol Aging* 25, 105-110.
- Casteilla L, Rigoulet M and Penicaud L (2001) Mitochondrial ROS metabolism: modulation by uncoupling proteins. *IUBMB Life* 52, 181-188.
- Cefalu WT, Wang ZQ, Bell-Farrow AD, Terry JG, Sonntag W, Waite M and Parks J (2000) Chronic caloric restriction alters muscle membrane fatty acid content. *Exp Gerontol* 35, 331-341.
- Ceriello A (2000) Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* 49, 27-29.
- Chance B and Williams GR (1955) Reespiratory enzymes in oxydative phosphorylation. III. The steady state. *J Biol Chem* 217, 409-427.
- Chanseaux E, Malpuech-Brugere C, Patrac V, Bielicki G, Rousset P, Couturier K, Salles J, Renou JP, Boirie Y and Morio B (2006) Diets high in sugar, fat, and energy induce muscle type-specific adaptations in mitochondrial functions in rats. *J Nutr* 136, 2194-2200.
- Charloux C, Paul M, Loisanse D and Astier A (1995) Inhibition of hydroxyl radical production by lactobionate, adenine, and tempol. *Free Radic Biol Med* 19, 699-704.
- Chen Q and Lesnefsky EJ (2006) Depletion of cardiolipin and cytochrome c during ischemia increases hydrogen peroxide production from the electron transport chain. *Free Radic Biol Med* 40, 976-982.
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL and Lesnefsky EJ (2003a) Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278, 36027-36031.
- Chen Q, Chai YC, Mazumder S, Jiang C, Macklis RM, Chisolm GM and Almasan A (2003b) The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome c release, caspase activation, and mitochondrial dysfunction. *Cell Death Differ* 10, 323-334.
- Chen YF, Cowley AW, Jr. and Zou AP (2003c) Increased H₂O₂ counteracts the vasodilator and natriuretic effects of superoxide dismutation by tempol in renal medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285, R827-833.
- Chicco A, D'Alessandro ME, Karabatas L, Pastorale C, Basabe JC and Lombardo YB (2003) Muscle lipid metabolism and insulin secretion are altered in insulin-resistant rats fed a high sucrose diet. *J Nutr* 133, 127-133.
- Chou CJ, Cha MC, Jung DW, Boozer CN, Hashim SA and Pi-Sunyer FX (2001) High-fat diet feeding elevates skeletal muscle uncoupling protein 3 levels but not its activity in rats. *Obes Res* 9, 313-319.
- Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, Macatagney R, Musu MP, Di Pierro MR, Drago S, Congia M and Fasano A (2003) Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut* 52, 218-223.
- Clerch LB and Massaro D (1993) Tolerance of rats to hyperoxia. Lung antioxidant enzyme gene expression. *J Clin Invest* 91, 499-508.
- Clerch LB, Massaro D and Berkovich A (1998) Molecular mechanisms of antioxidant enzyme expression in lung during exposure to and recovery from hyperoxia. *Am J Physiol* 274, L313-319.
- Cohen AM, Briller S and Shafrir E (1972) Effect of longterm sucrose feeding on the activity of some enzymes regulating glycolysis, lipogenesis and gluconeogenesis in rat liver and adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 279, 129-138.
- Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA and Strieter RM (1995) Chemokine expression during hepatic ischemia/reperfusion-induced lung injury in the rat. The role of epithelial neutrophil activating protein. *J Clin Invest* 95, 134-141.
- Commerford SR, Ferniza JB, Bizeau ME, Thresher JS, Willis WT and Pagliassotti MJ (2002) Diets enriched in sucrose or fat increase gluconeogenesis and G-6-Pase but not basal glucose production in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E545-555.
- Cortopassi GA, Shibata D, Soong NW and Arnheim N (1992) A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7370-7374.

Coupland RE, MacDougall JD, Myles WS and McCabe M (1969) The effect of hyperbaric oxygen on mitochondrial enzymes, lipid peroxides and adenosine triphosphate-induced contraction of mitochondria in organ cultures and cell fractions of rat liver. *J Pathol* 97, 63-77.

Couroucli XI, Welty SE, Geske RS and Moorthy B (2002) Regulation of pulmonary and hepatic cytochrome P4501A expression in the rat by hyperoxia: implications for hyperoxic lung injury. *Mol Pharmacol* 61, 507-515.

Couturier K, Servais S, Koubi H, Sempore B, Sornay-Mayet MH, Cottet-Emard JM, Lavoie JM and Favier R (2002) Metabolic characteristics and body composition in a model of anti-obese rats (Lou/C). *Obes Res* 10, 188-195.

Crapo JD (1986) Morphologic changes in pulmonary oxygen toxicity. *Annu Rev Physiol* 48, 721-731.

Crapo JD and Tierney DF (1974) Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am J Physiol* 226, 1401-1407.

-D-

D'Alessandro ME, Chicco A, Karabatas L and Lombardo YB (2000) Role of skeletal muscle on impaired insulin sensitivity in rats fed a sucrose-rich diet: effect of moderate levels of dietary fish oil. *J Nutr Biochem* 11, 273-280.

Delbosc S, Paizanis E, Magous R, Araiz C, Dimo T, Cristol JP, Cros G and Azay J (2005) Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat. *Atherosclerosis* 179, 43-49.

Delzenne NM and Kok NN (1999) Biochemical basis of oligofructose-induced hypolipidemia in animal models. *J Nutr* 129, 1467S-1470S.

Demel RA, Jordi W, Lambrechts H, van Damme H, Hovius R and de Kruijff B (1989) Differential interactions of apo- and holocytochrome c with acidic membrane lipids in model systems and the implications for their import into mitochondria. *J Biol Chem* 264, 3988-3997.

Dennog C, Hartmann A, Frey G and Speit G (1996) Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy. *Mutagenesis* 11, 605-609.

Dennog C, Radermacher P, Barnett YA and Speit G (1999) Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen. *Mutat Res* 428, 83-89.

Desai VG, Weindruch R, Hart RW and Feuers RJ (1996) Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. *Arch Biochem Biophys* 333, 145-151.

Dhahbi JM, Mote PL, Wingo J, Tillman JB, Walford RL and Spindler SR (1999) Calories and aging alter gene expression for gluconeogenic, glycolytic, and nitrogen-metabolizing enzymes. *Am J Physiol* 277, E352-360.

Dhahbi JM, Mote PL, Wingo J, Rowley BC, Cao SX, Walford RL and Spindler SR (2001) Caloric restriction alters the feeding response of key metabolic enzyme genes. *Mech Ageing Dev* 122, 1033-1048.

Di Giovanni S, Mirabella M, Papacci M, Odoardi F, Silvestri G and Servidei S (2001) Apoptosis and ROS detoxification enzymes correlate with cytochrome c oxidase deficiency in mitochondrial encephalomyopathies. *Mol Cell Neurosci* 17, 696-705.

Di Ilio C, Angelucci S, Bucciarelli T, Pennelli A, Petruzzelli R, Di Giulio C, Miranda M, Amicarelli F and Sacchetta P (1996) Alteration of glutathione transferase subunits composition in the liver of young and aged rats submitted to hypoxic and hyperoxic conditions. *Biochim Biophys Acta* 1312, 125-131.

Di Mauro S and Schon EA (2003) Mitochondrial respiratory - Chain diseases. *The New England Journal Medicine* 348, 2656-2668.

Dincer Y, Alademir Z, Ilkova H and Akcay T (2002) Susceptibility of glutathione and glutathione-related antioxidant activity to hydrogen peroxide in patients with type 2 diabetes: effect of glycemic control. *Clin Biochem* 35, 297-301.

Dodane V, Chevalier J, Bariety J, Pratz J and Corman B (1991) Longitudinal study of solute excretion and glomerular ultrastructure in an experimental model of aging rats free of kidney disease. *Lab Invest* 64, 377-391.

Donnelly R, Reed MJ, Azhar S and Reaven GM (1994) Expression of the major isoenzyme of protein kinase-C in skeletal muscle, nPKC theta, varies with muscle type and in response to fructose-induced insulin resistance. *Endocrinology* 135, 2369-2374.

Drew B, Phaneuf S, Dirks A, Selman C, Gredilla R, Lezza A, Barja G and Leeuwenburgh C (2003) Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284, R474-480.

Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47-95.

Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J and Brownlee M (2000) Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12222-12226.

Dumas JF, Roussel D, Simard G, Douay O, Foussard F, Malthiery Y and Ritz P (2004) Food restriction affects energy metabolism in rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1670, 126-131.

-E-

Echtay KS, Esteves TC, Pakay JL, Jekabsons MB, Lambert AJ, Portero-Otin M, Pamplona R, Vidal-Puig AJ, Wang S, Roebuck SJ and Brand MD (2003) A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *Embo J* 22, 4103-4110.

El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Averet N, Rigoulet M and Leverve X (2000) Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 275, 223-228.

El Hafidi M, Cuellar A, Ramirez J and Banos G (2001) Effect of sucrose addition to drinking water, that induces hypertension in the rats, on liver microsomal Delta9 and Delta5-desaturase activities. *J Nutr Biochem* 12, 396-403.

Ellis BA, Poynten A, Lowy AJ, Furler SM, Chisholm DJ, Kraegen EW and Cooney GJ (2000) Long-chain acyl-CoA esters as indicators of lipid metabolism and insulin sensitivity in rat and human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, E554-560.

Engelmann B (2004) Plasmalogens: targets for oxidants and major lipophilic antioxidants. *Biochem Soc Trans* 32, 147-150.

Essig DA and Nosek TM (1997) Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species? *Can J Appl Physiol* 22, 409-428.

Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA and Grodsky GM (2002) Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23, 599-622.

Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA and Grodsky GM (2003) Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 52, 1-8.

Evans WJ (2000) Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr* 72, 647S-652S.

Evelson P and Gonzalez-Flecha B (2000) Time course and quantitative analysis of the adaptive responses to 85% oxygen in the rat lung and heart. *Biochim Biophys Acta* 1523, 209-216.

Ezpeleta I, Arango MA, Irache JM, Stainmesse S, Chabenat C, Popineau Y and Orecchioni AM (1999) Preparation of Ulex europaeus lectin-gliadin nanoparticle conjugates and their interaction with gastrointestinal mucus. *Int J Pharm* 191, 25-32.

-F-

Fasano A, Not T, Wang W, Uzzau S, Berti I, Tommasini A and Goldblum SE (2000) Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet* 355, 1518-1519.

Faure P, Rossini E, Lafond JL, Richard MJ, Favier A and Halimi S (1997) Vitamin E improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity of rats fed high fructose diets. *J Nutr* 127, 103-107.

Faure P, Rossini E, Wiernsperger N, Richard MJ, Favier A and Halimi S (1999) An insulin sensitizer improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity in high fructose-fed rats. *Diabetes* 48, 353-357.

- Ferreira J and Gil L (1984) Nutritional effects on mitochondrial bioenergetics. Alterations in oxidative phosphorylation by rat liver mitochondria. *Biochem J* 218, 61-67.
- Fontaine E and Bernardi P (1999) Progress on the mitochondrial permeability transition pore: regulation by complex I and ubiquinone analogs. *J Bioenerg Biomembr* 31, 335-345.
- Fontaine E, Eriksson O, Ichas F and Bernardi P (1998) Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex i. *J Biol Chem* 273, 12662-12668.
- Fontaine EM, Moussa M, Devin A, Garcia J, Ghisolfi J, Rigoulet M and Leverve XM (1996) Effect of polyunsaturated fatty acids deficiency on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1276, 181-187.
- Frank L (1982) Protection from O₂ toxicity by preexposure to hypoxia: lung antioxidant enzyme role. *J Appl Physiol* 53, 475-482.
- Frank L, Iqbal J, Hass M and Massaro D (1989) New "rest period" protocol for inducing tolerance to high O₂ exposure in adult rats. *Am J Physiol* 257, L226-231.
- Faure P, Lafond JL (1995) Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxydation. In Favier AE, Cadet J, Kalnayanaraman M, Fontecave M, Pierre JL (Eds) *Analysis of free radicals in biological systems*. Birkäuser, Basel, Boston, Berlin, p 237-248.
- Freeman BA and Crapo JD (1981) Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem* 256, 10986-10992.
- Freeman BA, Young SL and Crapo JD (1983) Liposome-mediated augmentation of superoxide dismutase in endothelial cells prevents oxygen injury. *J Biol Chem* 258, 12534-12542.
- Freeman BA, Young SL and Crapo JD (1983) Liposome-mediated augmentation of superoxide dismutase in endothelial cells prevents oxygen injury. *J Biol Chem* 258, 12534-12542.
- Fukuchi S, Hamaguchi K, Seike M, Himeno K, Sakata T and Yoshimatsu H (2004) Role of fatty acid composition in the development of metabolic disorders in sucrose-induced obese rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 229, 486-493.

-G-

- Gardner HW (1989) Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radic Biol Med* 7, 65-86.
- Genova ML, Ventura B, Giuliano G, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G and Lenaz G (2001) The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Lett* 505, 364-368.
- Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P and Fenn WO (1954) Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* 119, 623-626.
- Giri SN and Misra HP (1984) Fate of superoxide dismutase in mice following oral route of administration. *Med Biol* 62, 285-289.
- Gnaiger E and Kuznetsov AV (2002) Mitochondrial respiration at low levels of oxygen and cytochrome c. *Biochem Soc Trans* 30, 252-258.
- Gnaiger E, Lassnig B, Kuznetsov A, Rieger G and Margreiter R (1998) Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase. *J Exp Biol* 201, 1129-1139.
- Gokkusu C, Palanduz S, Ademoglu E and Tamer S (2001) Oxidant and antioxidant systems in niddm patients: influence of vitamin E supplementation. *Endocr Res* 27, 377-386.
- Gonder JC, Proctor RA and Will JA (1985) Genetic differences in oxygen toxicity are correlated with cytochrome P-450 inducibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 6315-6319.
- Gredilla R and Barja G (2005) Minireview: the role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology* 146, 3713-3717.
- Gredilla R, Barja G and Lopez-Torres M (2001a) Effect of short-term caloric restriction on H₂O₂ production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria and location of the free radical source. *J Bioenerg Biomembr* 33, 279-287.

- Gredilla R, Sanz A, Lopez-Torres M and Barja G (2001b) Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *Faseb J* 15, 1589-1591.
- Green DR and Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Green K, Brand MD and Murphy MP (2004) Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 1, S110-118.
- Green PS, Gordon K and Simpkins JW (1997) Phenolic A ring requirement for the neuroprotective effects of steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 63, 229-235.
- Greenberg JA and Boozer CN (2000) Metabolic mass, metabolic rate, caloric restriction, and aging in male Fischer 344 rats. *Mech Ageing Dev* 113, 37-48.
- Griel AE, Ruder EH and Kris-Etherton PM (2006) The changing roles of dietary carbohydrates: from simple to complex. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1958-1965.
- Gunzler WA, Kremers H and Flohe L (1974) An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1-11-1-9-) in blood. *Z Klin Chem Klin Biochem* 12, 444-448.
- Gutman RA, Basilico MZ, Bernal CA, Chicco A and Lombardo YB (1987) Long-term hypertriglyceridemia and glucose intolerance in rats fed chronically an isocaloric sucrose-rich diet. *Metabolism* 36, 1013-1020.
- Gutteridge JM and Halliwell B (1992) Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radic Biol Med* 12, 93-95.

-H-

- Hagopian K, Ramsey JJ and Weindruch R (2003a) Influence of age and caloric restriction on liver glycolytic enzyme activities and metabolite concentrations in mice. *Exp Gerontol* 38, 253-266.
- Hagopian K, Ramsey JJ and Weindruch R (2003b) Caloric restriction increases gluconeogenic and transaminase enzyme activities in mouse liver. *Exp Gerontol* 38, 267-278.
- Hagopian K, Harper ME, Ram JJ, Humble SJ, Weindruch R and Ramsey JJ (2005) Long-term calorie restriction reduces proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E674-684.
- Hagstrom-Toft E, Thorne A, Reynisdottir S, Moberg E, Rossner S, Bolinder J and Arner P (2001) Evidence for a major role of skeletal muscle lipolysis in the regulation of lipid oxidation during caloric restriction in vivo. *Diabetes* 50, 1604-1611.
- Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D and Cadenas E (2003) Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem* 278, 5557-5563.
- Hansford RG, Hogue BA and Mildaziene V (1997) Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr* 29, 89-95.
- Harman D (1981) The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7124-7128.
- Helies JM, Diane A, Langlois A, Larue-Achagiotis C, Fromentin G, Tome D, Mormede P and Marissal-Arvy N (2005) Comparison of fat storage between Fischer 344 and obesity-resistant Lou/C rats fed different diets. *Obes Res* 13, 3-10.
- Henderson WR, Jr. (1994) The role of leukotrienes in inflammation. *Ann Intern Med* 121, 684-697.
- Herrero A and Barja G (1997) Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon. *Mech Ageing Dev* 98, 95-111.
- Herrero A and Barja G (2000) Localization of the Site of Oxygen Radical Generation inside the Complex I of Heart and Nonsynaptic Brain Mammalian Mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 32, 609-615.
- Hesselink MK, Mensink M and Schrauwen P (2003) Human uncoupling protein-3 and obesity: an update. *Obes Res* 11, 1429-1443.
- Higashiura K, Ura N, Takada T, Agata J, Yoshida H, Miyazaki Y and Shimamoto K (1999) Alteration of muscle fiber composition linking to insulin resistance and hypertension in fructose-fed rats. *Am J Hypertens* 12, 596-602.

- Himms-Hagen J and Harper ME (2001) Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 226, 78-84.
- Ho YS, Vincent R, Dey MS, Slot JW and Crapo JD (1998) Transgenic models for the study of lung antioxidant defense: enhanced manganese-containing superoxide dismutase activity gives partial protection to B6C3 hybrid mice exposed to hyperoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18, 538-547.
- Hoch FL (1992) Cardiolipins and biomembrane function. *Biochim Biophys Acta* 1113, 71-133.
- Hong JH, Kim MJ, Park MR, Kwag OG, Lee IS, Byun BH, Lee SC, Lee KB and Rhee SJ (2004) Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta* 340, 107-115.
- Horton TJ, Gayles EC, Prach PA, Koppenhafer TA and Pagliassotti MJ (1997) Female rats do not develop sucrose-induced insulin resistance. *Am J Physiol* 272, R1571-1576.
- Huang BW, Chiang MT, Yao HT and Chiang W (2004) The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. *Diabetes Obes Metab* 6, 120-126.
- Huang TT, Carlson EJ, Kozy HM, Mantha S, Goodman SI, Ursell PC and Epstein CJ (2001) Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic Biol Med* 31, 1101-1110.
- Hulbert AJ (2005) On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J Theor Biol* 234, 277-288.
- Hunt JV, Dean RT and Wolff SP (1988) Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J* 256, 205-212.

-I-

- Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H and Nawata H (2000) High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 49, 1939-1945.
- Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Barletta A and Liverini G (2000) Effect of long-term high-fat feeding on energy balance and liver oxidative activity in rats. *Br J Nutr* 84, 377-385.
- Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Botta M, Barletta A and Liverini G (2003) Effect of high-fat feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adult rats. *Br J Nutr* 90, 953-960.
- Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Botta M, Samec S, Dulloo AG and Liverini G (2001) Differences in proton leak kinetics, but not in UCP3 protein content, in subsarcolemmal and intermyofibrillar skeletal muscle mitochondria from fed and fasted rats. *FEBS Lett* 505, 53-56.

-J-

- Jackson RM and Frank L (1984) Ozone-induced tolerance to hyperoxia in rats. *Am Rev Respir Dis* 129, 425-429.
- Jamieson D, Chance B, Cadenas E and Boveris A (1986) The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu Rev Physiol* 48, 703-719.
- Jansen PL (2002) Liver disease in the elderly. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 16, 149-158.
- Ji LL, Fu R and Mitchell EW (1992) Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol* 73, 1854-1859.

-K-

- Kahn BB (1992) Facilitative glucose transporters: regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes. *J Clin Invest* 89, 1367-1374.

- Kappeler L, Zizzari P, Alliot J, Epelbaum J and Bluett-Pajot MT (2004) Delayed age-associated decrease in growth hormone pulsatile secretion and increased orexigenic peptide expression in the Lou C/JaLL rat. *Neuroendocrinology* 80, 273-283.
- Kashiwagi A, Shinozaki K, Nishio Y, Okamura T, Toda N and Kikkawa R (1999) Free radical production in endothelial cells as a pathogenetic factor for vascular dysfunction in the insulin resistance state. *Diabetes Res Clin Pract* 45, 199-203.
- Kennedy KA, Snyder JM, Stenzel W, Saito K and Warshaw JB (1990) Vitamin E alters alveolar type II cell phospholipid synthesis in oxygen and air. *Exp Lung Res* 16, 607-615.
- Kimball RE, Reddy K, Peirce TH, Schwartz LW, Mustafa MG and Cross CE (1976) Oxygen toxicity: augmentation of antioxidant defense mechanisms in rat lung. *Am J Physiol* 230, 1425-1431.
- Kok N, Roberfroid M and Delzenne N (1996a) Dietary oligofructose modifies the impact of fructose on hepatic triacylglycerol metabolism. *Metabolism* 45, 1547-1550.
- Kok N, Roberfroid M, Robert A and Delzenne N (1996b) Involvement of lipogenesis in the lower VLDL secretion induced by oligofructose in rats. *Br J Nutr* 76, 881-890.
- Korshunov SS, Skulachev VP and Starkov AA (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416, 15-18.
- Korshunov SS, Korkina OV, Ruuge EK, Skulachev VP and Starkov AA (1998) Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of O₂·- and H₂O₂ by mitochondria in the resting state. *FEBS Lett* 435, 215-218.
- Kowaltowski AJ, Castilho RF and Vercesi AE (2001) Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 495, 12-15.
- Krause KH (2004) Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn J Infect Dis* 57, S28-29.
- Kristal BS, Matsuda M and Yu BP (1996) Abnormalities in the mitochondrial permeability transition in diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 222, 519-523.
- Kritchevsky D (1993) Colorectal cancer: the role of dietary fat and caloric restriction. *Mutat Res* 290, 63-70.
- Kroemer G, Zamzami N and Susin SA (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 18, 44-51.
- Krook A, Digby J, O'Rahilly S, Zierath JR and Wallberg-Henriksson H (1998) Uncoupling protein 3 is reduced in skeletal muscle of NIDDM patients. *Diabetes* 47, 1528-1531.
- Ksenzenko M, Konstantinov AA, Khomutov GB, Tikhonov AN and Ruuge EK (1984) Relationships between the effects of redox potential, alpha-thenoyltrifluoroacetone and malonate on O₂ and H₂O₂ generation by submitochondrial particles in the presence of succinate and antimycin. *FEBS Lett* 175, 105-108.
- Kushnareva Y, Murphy AN and Andreyev A (2002) Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J* 368, 545-553.

-L-

- Lal SB, Ramsey JJ, Monemdjou S, Weindruch R and Harper ME (2001) Effects of caloric restriction on skeletal muscle mitochondrial proton leak in aging rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56, B116-122.
- Lambert K, Py G, Robert E and Mercier J (2003) Does high-sucrose diet alter skeletal muscle and liver mitochondrial respiration? *Horm Metab Res* 35, 546-550.
- Lass A, Sohal BH, Weindruch R, Forster MJ and Sohal RS (1998) Caloric restriction prevents age-associated accrual of oxidative damage to mouse skeletal muscle mitochondria. *Free Radic Biol Med* 25, 1089-1097.
- Lauterburg BH, Adams JD and Mitchell JR (1984) Hepatic glutathione homeostasis in the rat: efflux accounts for glutathione turnover. *Hepatology* 4, 586-590.
- Laybutt DR, Schmitz-Peiffer C, Saha AK, Ruderman NB, Biden TJ and Kraegen EW (1999) Muscle lipid accumulation and protein kinase C activation in the insulin-resistant chronically glucose-infused rat. *Am J Physiol* 277, E1070-1076.
- Lee AY and Chung SS (1999) Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *Faseb J* 13, 23-30.

- Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM and Edwards MJ (2000) Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 32, 169-173.
- Lesnefsky EJ, Chen Q, Slabe TJ, Stoll MS, Minkler PE, Hassan MO, Tandler B and Hoppel CL (2004) Ischemia, rather than reperfusion, inhibits respiration through cytochrome oxidase in the isolated, perfused rabbit heart: role of cardiolipin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H258-267.
- Leverve X (2003) Hyperglycemia and oxidative stress: complex relationships with attractive prospects. *Intensive Care Med* 29, 511-514.
- Levi B and Werman MJ (1998) Long-term fructose consumption accelerates glycation and several age-related variables in male rats. *J Nutr* 128, 1442-1449.
- Levine RL (2002) Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* 32, 790-796.
- Lewis GF, Carpentier A, Adeli K and Giacca A (2002) Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23, 201-229.
- Li J, Gao X, Qian M and Eaton JW (2004) Mitochondrial metabolism underlies hyperoxic cell damage. *Free Radic Biol Med* 36, 1460-1470.
- Liu Y, Fiskum G and Schubert D (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 80, 780-787.
- Lombardo YB, Drago S, Chicco A, Fainstein-Day P, Gutman R, Gagliardino JJ and Gomez Dumm CL (1996) Long-term administration of a sucrose-rich diet to normal rats: relationship between metabolic and hormonal profiles and morphological changes in the endocrine pancreas. *Metabolism* 45, 1527-1532.
- Lopez-Torres M, Gredilla R, Sanz A and Barja G (2002) Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol Med* 32, 882-889.
- Loschen G, Azzi A and Flohe L (1973) Mitochondrial H₂O₂ formation: relationship with energy conservation. *FEBS Lett* 33, 84-87.

-M-

- Madapallimattam AG, Law L and Jeejeebhoy KN (2002) Effect of hypoenergetic feeding on muscle oxidative phosphorylation and mitochondrial complex I-IV activities in rats. *Am J Clin Nutr* 76, 1031-1039.
- Maddux BA, See W, Lawrence JC, Jr., Goldfine AL, Goldfine ID and Evans JL (2001) Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes* 50, 404-410.
- Maechler P, Jornot L and Wollheim CB (1999) Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 274, 27905-27913.
- Malleske DT, Rogers LK, Velluci SM, Young TL, Park MS, Long DW, Welty SE, Smith CV and Nelin LD (2006) Hyperoxia increases hepatic arginase expression and ornithine production in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*.
- Marklund S and Marklund G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47, 469-474.
- Marnett LJ (1999) Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424, 83-95.
- Masoro EJ (2000) Caloric restriction and aging: an update. *Exp Gerontol* 35, 299-305.
- Mataix J, Quiles JL, Huertas JR, Battino M and Manas M (1998) Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 24, 511-521.
- Mates JM, Perez-Gomez C and Nunez de Castro I (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32, 595-603.
- Mauguet MC, Legrand J, Brujes L, Carnelle G, Larre C and Popineau Y (2002) Gliadin matrices for microencapsulation processes by simple coacervation method. *J Microencapsul* 19, 377-384.
- Mayes PA (1993) Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr* 58, 754S-765S.

- McCarter RJ and McGee JR (1989) Transient reduction of metabolic rate by food restriction. *Am J Physiol* 257, E175-179.
- McCusker RH, Deaver OE, Jr. and Berdanier CD (1983) Effect of sucrose or starch feeding on the hepatic mitochondrial activity of BHE and Wistar rats. *J Nutr* 113, 1327-1334.
- McDonald RB (1995) Influence of dietary sucrose on biological aging. *Am J Clin Nutr* 62, 284S-292S; discussion 292S-293S.
- McKelvey TG, Hollwarth ME, Granger DN, Engerson TD, Landler U and Jones HP (1988) Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney. *Am J Physiol* 254, G753-760.
- Mendelsohn ME and Karas RH (1999) The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 340, 1801-1811.
- Merry BJ (2002) Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 1340-1354.
- Miralles C, Agusti AG, Aubry C, Sanchez JC, Walzer C, Hochstrasser D and Busquets X (2000) Changes induced by oxygen in rat liver proteins identified by high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Eur J Biochem* 267, 5580-5584.
- Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.
- Molnar AM, Servais S, Guichardant M, Lagarde M, Macedo DV, Pereira-Da-Silva L, Sibille B and Favier R (2006) Mitochondrial H₂O₂ production is reduced with acute and chronic eccentric exercise in rat skeletal muscle. *Antioxid Redox Signal* 8, 548-558.
- Moorthy B, Parker KM, Smith CV, Bend JR and Welty SE (2000) Potentiation of oxygen-induced lung injury in rats by the mechanism-based cytochrome P-450 inhibitor, 1-aminobenzotriazole. *J Pharmacol Exp Ther* 292, 553-560.
- Moorthy B, Nguyen UT, Gupta S, Stewart KD, Welty SE and Smith CV (1997) Induction and decline of hepatic cytochromes P4501A1 and 1A2 in rats exposed to hyperoxia are not paralleled by changes in glutathione S-transferase-alpha. *Toxicol Lett* 90, 67-75.
- Morel Y, Mermod N and Barouki R (1999) An autoregulatory loop controlling CYP1A1 gene expression: role of H(2)O(2) and NFI. *Mol Cell Biol* 19, 6825-6832.
- Murphy MP (1989) Slip and leak in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 977, 123-141.
- Muth CM, Glenz Y, Klaus M, Radermacher P, Speit G and Leverve X (2004) Influence of an orally effective SOD on hyperbaric oxygen-related cell damage. *Free Radic Res* 38, 927-932.
- Mysore TB, Shinkel TA, Collins J, Salvaris EJ, Fiscaro N, Murray-Segal LJ, Johnson LE, Lepore DA, Walters SN, Stokes R, Chandra AP, O'Connell PJ, d'Apice AJ and Cowan PJ (2005) Overexpression of glutathione peroxidase with two isoforms of superoxide dismutase protects mouse islets from oxidative injury and improves islet graft function. *Diabetes* 54, 2109-2116.

-N-

- Nagamine K, Kubota T, Togo S, Nagashima Y, Mori M and Shimada H (2004) Beneficial effect of hyperbaric oxygen therapy on liver regeneration after 90% hepatectomy in rats. *Eur Surg Res* 36, 350-356.
- Nagan N and Zoeller RA (2001) Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog Lipid Res* 40, 199-229.
- Naito Y, Akagiri S, Uchiyama K, Kokura S, Yoshida N, Hasegawa G, Nakamura N, Ichikawa H, Toyokuni S, Ijichi T and Yoshikawa T (2005) Reduction of diabetes-induced renal oxidative stress by a cantaloupe melon extract/gliadin biopolymers, oxykine, in mice. *Biofactors* 23, 85-95.
- Nassar T, Kadery B, Lotan C, Da'as N, Kleinman Y and Haj-Yehia A (2002) Effects of the superoxide dismutase-mimetic compound tempol on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 436, 111-118.

Negre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Troly M, Salvayre R, Penicaud L and Casteilla L (1997) A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Faseb J* 11, 809-815.

Newby FD, DiGirolamo M, Cotsonis GA and Kutner MH (1990) Model of spontaneous obesity in aging male Wistar rats. *Am J Physiol* 259, R1117-1125.

Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I and Brownlee M (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404, 787-790.

Nogueira V, Rigoulet M, Piquet MA, Devin A, Fontaine E and Leverve XM (2001) Mitochondrial respiratory chain adjustment to cellular energy demand. *J Biol Chem* 276, 46104-46110.

Nomura K, Imai H, Koumura T, Kobayashi T and Nakagawa Y (2000) Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem J* 351, 183-193.

Nourooz-Zadeh J, Rahimi A, Tajaddini-Sarmadi J, Tritschler H, Rosen P, Halliwell B and Betteridge DJ (1997) Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. *Diabetologia* 40, 647-653.

Nurjhan N, Consoli A and Gerich J (1992) Increased lipolysis and its consequences on gluconeogenesis in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 89, 169-175.

-O-

Ochoa JJ, Quiles JL, Ibanez S, Martinez E, Lopez-Frias M, Huertas JR and Mataix J (2003) Aging-related oxidative stress depends on dietary lipid source in rat postmitotic tissues. *J Bioenerg Biomembr* 35, 267-275.

Okada F, Shionoya H, Kobayashi M, Kobayashi T, Tazawa H, Onuma K, Iuchi Y, Matsubara N, Ijichi T, Dugas B and Hosokawa M (2006) Prevention of inflammation-mediated acquisition of metastatic properties of benign mouse fibrosarcoma cells by administration of an orally available superoxide dismutase. *Br J Cancer* 94, 854-862.

Okado-Matsumoto A and Fridovich I (2001) Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 276, 38388-38393.

Okamoto T, Mitsushashi M, Fujita I, Sindhu RK and Kikkawa Y (1993) Induction of cytochrome P450 1A1 and 1A2 by hyperoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 197, 878-885.

Okaya T, Holthaus R, Kato A and Lentsch AB (2004) Involvement of the neuropeptide substance P in lung inflammation induced by hepatic ischemia/reperfusion. *Inflamm Res* 53, 257-261.

Ookhtens M and Kaplowitz N (1998) Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. *Semin Liver Dis* 18, 313-329.

Ozden TA, Uzun H, Bohloli M, Toklu AS, Paksoy M, Simsek G, Durak H, Issever H and Ipek T (2004) The effects of hyperbaric oxygen treatment on oxidant and antioxidants levels during liver regeneration in rats. *Tohoku J Exp Med* 203, 253-265.

-P-

Packer L, Tritschler HJ and Wessel K (1997) Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med* 22, 359-378.

Padmanabhan RV, Gudapaty R, Liener IE, Schwartz BA and Hoidal JR (1985) Protection against pulmonary oxygen toxicity in rats by the intratracheal administration of liposome-encapsulated superoxide dismutase or catalase. *Am Rev Respir Dis* 132, 164-167.

Pagliassotti MJ, Shahrokhi KA and Moscarello M (1994) Involvement of liver and skeletal muscle in sucrose-induced insulin resistance: dose-response studies. *Am J Physiol* 266, R1637-1644.

Pagliassotti MJ, Prach PA, Koppenhafer TA and Pan DA (1996) Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats. *Am J Physiol* 271, R1319-1326.

- Pamplona R, Portero-Otin M, Requena J, Gredilla R and Barja G (2002) Oxidative, glycoxidative and lipoxidative damage to rat heart mitochondrial proteins is lower after 4 months of caloric restriction than in age-matched controls. *Mech Ageing Dev* 123, 1437-1446.
- Pamplona R, Portero-Otin M, Ruiz C, Gredilla R, Herrero A and Barja G (2000) Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech Ageing Dev* 112, 169-183.
- Paolisso G, D'Amore A, Giugliano D, Ceriello A, Varricchio M and D'Onofrio F (1993) Pharmacologic doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetic patients. *Am J Clin Nutr* 57, 650-656.
- Paolisso G, Gambardella A, Tagliamonte MR, Saccomanno F, Salvatore T, Gualdiero P, D'Onofrio MV and Howard BV (1996) Does free fatty acid infusion impair insulin action also through an increase in oxidative stress? *J Clin Endocrinol Metab* 81, 4244-4248.
- Papa S and Skulachev VP (1997) Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem* 174, 305-319.
- Papa S, Guerrieri F and Capitanio N (1997) A possible role of slips in cytochrome C oxidase in the antioxygen defense system of the cell. *Biosci Rep* 17, 23-31.
- Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M and Ruggiero FM (2000) The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome c oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles. *FEBS Lett* 466, 323-326.
- Parks DA, Williams TK and Beckman JS (1988) Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am J Physiol* 254, G768-774.
- Paulson DJ, Ward KM and Shug AL (1984) Malonyl CoA inhibition of carnitine palmityltransferase in rat heart mitochondria. *FEBS Lett* 176, 381-384.
- Peng J, Jones GL and Watson K (2000) Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. *Free Radic Biol Med* 28, 1598-1606.
- Perez-Carreras M, Del Hoyo P, Martin MA, Rubio JC, Martin A, Castellano G, Colina F, Arenas J and Solis-Herruzo JA (2003) Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 38, 999-1007.
- Perrin D, Soulage C, Pequignot JM and Geloën A (2003) Resistance to obesity in Lou/C rats prevents ageing-associated metabolic alterations. *Diabetologia* 46, 1489-1496.
- Piquet MA, Nogueira V, Devin A, Sibille B, Filippi C, Fontaine E, Roulet M, Rigoulet M and Leverve XM (2000) Chronic ethanol ingestion increases efficiency of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *FEBS Lett* 468, 239-242.
- Pollack M, Phaneuf S, Dirks A and Leeuwenburgh C (2002) The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. *Ann N Y Acad Sci* 959, 93-107.
- Porter RK, Hulbert AJ and Brand MD (1996) Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition. *Am J Physiol* 271, R1550-1560.
- Powers SK and Lennon SL (1999) Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58, 1025-1033.
- Prentki M and Corkey BE (1996) Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes* 45, 273-283.

-R-

- Ramanadham M and Kaplay SS (1978) Rat liver mitochondrial cytochrome c oxidase and cytochromes in experimental protein-energy malnutrition. *Nutr Metab* 22, 73-81.
- Ramanadham M and Kaplay SS (1979) Response of oxidative phosphorylation in liver of protein-energy malnourished rats. *Nutr Metab* 23, 235-240.
- Ramsay RR, Steenkamp DJ and Husain M (1987) Reactions of electron-transfer flavoprotein and electron-transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductase. *Biochem J* 241, 883-892.

- Ramsey JJ, Harper ME and Weindruch R (2000) Restriction of energy intake, energy expenditure, and aging. *Free Radic Biol Med* 29, 946-968.
- Ramsey JJ, Hagopian K, Kenny TM, Koomson EK, Bevilacqua L, Weindruch R and Harper ME (2004) Proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria from energy-restricted rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E31-40.
- Reaven GM (1988) Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37, 1595-1607.
- Regnault C, Soursac M, Roch-Arveiller M, Postaire E and Hazebroucq G (1996) Pharmacokinetics of superoxide dismutase in rats after oral administration. *Biopharm Drug Dispos* 17, 165-174.
- Renard D, Robert P, Lavenant L, Melcion D, Popineau Y, Gueguen J, Duclairoir C, Nakache E, Sanchez C and Schmitt C (2002) Biopolymeric colloidal carriers for encapsulation or controlled release applications. *Int J Pharm* 242, 163-166.
- Richard MJ, Portal B, Meo J, Coudray C, Hadjian A and Favier A (1992) Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. *Clin Chem* 38, 704-709.
- Richter C, Park JW and Ames BN (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6465-6467.
- Ricquier D (2005) Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. *Proc Nutr Soc* 64, 47-52.
- Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A and Vaziri ND (2006) Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism* 55, 928-934.
- Robertson RP, Harmon J, Tran PO and Poitout V (2004) Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 1, S119-124.
- Robinson NC, Zborowski J and Talbert LH (1990) Cardiolipin-depleted bovine heart cytochrome c oxidase: binding stoichiometry and affinity for cardiolipin derivatives. *Biochemistry* 29, 8962-8969.
- Rolfe DF and Brand MD (1996) Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate. *Am J Physiol* 271, C1380-1389.
- Rolfe DF and Brown GC (1997) Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 77, 731-758.
- Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ and Packer L (2001) The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev* 17, 189-212.
- Rusakow LS, White CW and Stabler SP (1993) O₂-induced changes in lung and storage pool thiols in mice: effect of superoxide dismutase. *J Appl Physiol* 74, 989-997.

-S-

- Sakai K, Matsumoto K, Nishikawa T, Suefuji M, Nakamaru K, Hirashima Y, Kawashima J, Shirotani T, Ichinose K, Brownlee M and Araki E (2003) Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 216-222.
- Salonen JT, Nyyssonen K, Tuomainen TP, Maenpaa PH, Korpela H, Kaplan GA, Lynch J, Helmrich SP and Salonen R (1995) Increased risk of non-insulin dependent diabetes mellitus at low plasma vitamin E concentrations: a four year follow up study in men. *Bmj* 311, 1124-1127.
- Saltiel AR (2000) Series introduction: the molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular diseases. *J Clin Invest* 106, 163-164.
- Samec S, Seydoux J and Dulloo AG (1998) Role of UCP homologues in skeletal muscles and brown adipose tissue: mediators of thermogenesis or regulators of lipids as fuel substrate? *Faseb J* 12, 715-724.
- Sanz A, Caro P and Barja G (2004) Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. *J Bioenerg Biomembr* 36, 545-552.

- Schagger H and von Jagow G (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199, 223-231.
- Schalkwijk CG, Stehouwer CD and van Hinsbergh VW (2004) Fructose-mediated non-enzymatic glycation: sweet coupling or bad modification. *Diabetes Metab Res Rev* 20, 369-382.
- Schrauwen P and Hesselink M (2002) UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. *J Exp Biol* 205, 2275-2285.
- Schrauwen P, Hoppeler H, Billeter R, Bakker AH and Pendergast DR (2001a) Fiber type dependent upregulation of human skeletal muscle UCP2 and UCP3 mRNA expression by high-fat diet. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25, 449-456.
- Schrauwen P, Hesselink MK, Blaak EE, Borghouts LB, Schaart G, Saris WH and Keizer HA (2001b) Uncoupling protein 3 content is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 50, 2870-2873.
- Sentman ML, Granstrom M, Jakobson H, Reaume A, Basu S and Marklund SL (2006) Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J Biol Chem* 281, 6904-6909.
- Servais S, Couturier K, Koubi H, Rouanet JL, Desplanches D, Sornay-Mayet MH, Sempore B, Lavoie JM and Favier R (2003) Effect of voluntary exercise on H₂O₂ release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Free Radic Biol Med* 35, 24-32.
- Sharma A, Kharb S, Chugh SN, Kakkar R and Singh GP (2000) Evaluation of oxidative stress before and after control of glycemia and after vitamin E supplementation in diabetic patients. *Metabolism* 49, 160-162.
- Shulman GI (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106, 171-176.
- Simoneau JA, Veerkamp JH, Turcotte LP and Kelley DE (1999) Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *Faseb J* 13, 2051-2060.
- Sindhu RK, Koo JR, Roberts CK and Vaziri ND (2004) Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes: response to insulin and antioxidant therapies. *Clin Exp Hypertens* 26, 43-53.
- Siskova A and Wilhelm J (2001) The effects of hyperoxia, hypoxia, and ischemia/reperfusion on the activity of cytochrome oxidase from the rat retina. *Physiol Res* 50, 267-273.
- Skulachev VP (1996) Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett* 397, 7-10.
- Skulachev VP (1998) Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett* 423, 275-280.
- Slim RM, Toborek M, Watkins BA, Boissonneault GA and Hennig B (1996) Susceptibility to hepatic oxidative stress in rabbits fed different animal and plant fats. *J Am Coll Nutr* 15, 289-294.
- Sohal RS and Weindruch R (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273, 59-63.
- Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, Forster MJ and Lal H (1994) Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech Ageing Dev* 74, 121-133.
- Soria A, D'Alessandro ME and Lombardo YB (2001) Duration of feeding on a sucrose-rich diet determines metabolic and morphological changes in rat adipocytes. *J Appl Physiol* 91, 2109-2116.
- Sparks LM, Xie H, Koza RA, Mynatt R, Hulver MW, Bray GA and Smith SR (2005) A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes* 54, 1926-1933.
- Spolarics Z (1999) A carbohydrate-rich diet stimulates glucose-6-phosphate dehydrogenase expression in rat hepatic sinusoidal endothelial cells. *J Nutr* 129, 105-108.
- Spolarics Z and Meyenhofer M (2000) Augmented resistance to oxidative stress in fatty rat livers induced by a short-term sucrose-rich diet. *Biochim Biophys Acta* 1487, 190-200.

- Sreekumar R, Unnikrishnan J, Fu A, Nygren J, Short KR, Schimke J, Barazzoni R and Nair KS (2002a) Impact of high-fat diet and antioxidant supplement on mitochondrial functions and gene transcripts in rat muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E1055-1061.
- Sreekumar R, Unnikrishnan J, Fu A, Nygren J, Short KR, Schimke J, Barazzoni R and Nair KS (2002b) Effects of caloric restriction on mitochondrial function and gene transcripts in rat muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E38-43.
- Srividhya S and Anuradha CV (2002) Metformin improves liver antioxidant potential in rats fed a high-fructose diet. *Asia Pac J Clin Nutr* 11, 319-322.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ and Brand MD (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277, 44784-44790.
- Starkov AA and Fiskum G (2003) Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *J Neurochem* 86, 1101-1107.
- Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R and Culotta VC (2001) A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem* 276, 38084-38089.
- Sugioka K, Shimosegawa Y and Nakano M (1987) Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation. *FEBS Lett* 210, 37-39.

-T-

- Tager JM, Groen AK, Wanders RJ, Duszyński J, Westerhoff HV and Vervoorn RC (1983) Control of mitochondrial respiration. *Biochem Soc Trans* 11, 40-43.
- Tahep İd P, Valen G, Starkopf J, Kairane C, Zilmer M and Vaage J (2001) Pretreating rats with hyperoxia attenuates ischemia-reperfusion injury of the heart. *Life Sci* 68, 1629-1640.
- Thannickal VJ and Fanburg BL (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L1005-1028.
- Thirunavukkarasu V and Anuradha CV (2004) Influence of alpha-lipoic acid on lipid peroxidation and antioxidant defence system in blood of insulin-resistant rats. *Diabetes Obes Metab* 6, 200-207.
- Thorburn AW, Storlien LH, Jenkins AB, Khouri S and Kraegen EW (1989) Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. *Am J Clin Nutr* 49, 1155-1163.
- Thresher JS, Podolin DA, Wei Y, Mazzeo RS and Pagliassotti MJ (2000) Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279, R1334-1340.
- Tian L, Cai Q and Wei H (1998) Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radic Biol Med* 24, 1477-1484.
- Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J and Lenzen S (1997) Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46, 1733-1742.
- Tiedge M, Lortz S, Munday R and Lenzen S (1998) Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species. *Diabetes* 47, 1578-1585.
- Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335-344.
- Turrens JF and Boveris A (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191, 421-427.
- Turrens JF, Freeman BA and Crapo JD (1982) Hyperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes. *Arch Biochem Biophys* 217, 411-421.
- Turrens JF, Crapo JD and Freeman BA (1984) Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J Clin Invest* 73, 87-95.
- Turrens JF, Alexandre A and Lehninger AL (1985) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 237, 408-414.

-V-

Vanhove G, Van Veldhoven PP, Eyssen HJ and Mannaerts GP (1993) Mitochondrial short-chain acyl-CoA dehydrogenase of human liver and kidney can function as an oxidase. *Biochem J* 292 (Pt 1), 23-30.

Vasdev S, Longerich L and Gill V (2004) Prevention of fructose-induced hypertension by dietary vitamins. *Clin Biochem* 37, 1-9.

Vazquez-Memije ME, Cardenas-Mendez MJ, Tolosa A and Hafidi ME (2005) Respiratory chain complexes and membrane fatty acids composition in rat testis mitochondria throughout development and ageing. *Exp Gerontol* 40, 482-490.

Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Grijalba MT, Meinicke AR and Castilho RF (1997) The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci Rep* 17, 43-52.

Veyrat-Durebex C and Alliot J (1997) Changes in pattern of macronutrient intake during aging in male and female rats. *Physiol Behav* 62, 1273-1278.

Veyrat-Durebex C, Boghossian S and Alliot J (1998) Age-related changes in adaptive mechanisms of macronutrient self-selection: evidence for a sexual dimorphism. *Mech Ageing Dev* 103, 223-234.

Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, Szczepanik A, Wade J, Mootha V, Cortright R, Muoio DM and Lowell BB (2000) Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem* 275, 16258-16266.

Votyakova TV and Reynolds IJ (2001) DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem* 79, 266-277.

Vouldoukis I, Lacan D, Kamate C, Coste P, Calenda A, Mazier D, Conti M and Dugas B (2004a) Antioxidant and anti-inflammatory properties of a Cucumis melo LC. extract rich in superoxide dismutase activity. *J Ethnopharmacol* 94, 67-75.

Vouldoukis I, Conti M, Krauss P, Kamate C, Blazquez S, Tefit M, Mazier D, Calenda A and Dugas B (2004b) Supplementation with gliadin-combined plant superoxide dismutase extract promotes antioxidant defences and protects against oxidative stress. *Phytother Res* 18, 957-962.

-W-

Wang W, Uzzau S, Goldblum SE and Fasano A (2000) Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci* 113 Pt 24, 4435-4440.

Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM and Wautier JL (2001) Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E685-694.

Welch WJ (1992) Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72, 1063-1081.

West DB and York B (1998) Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. *Am J Clin Nutr* 67, 505S-512S.

White CW, Avraham KB, Shanley PF and Groner Y (1991) Transgenic mice with expression of elevated levels of copper-zinc superoxide dismutase in the lungs are resistant to pulmonary oxygen toxicity. *J Clin Invest* 87, 2162-2168.

Wiedemann FR and Kunz WS (1998) Oxygen dependence of flux control of cytochrome c oxidase -- implications for mitochondrial diseases. *FEBS Lett* 422, 33-35.

Williams JN, Jr. (1964) A Method For The Simultaneous Quantitative Estimation Of Cytochromes A, B, C1, And C In Mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 107, 537-543.

Wispe JR, Warner BB, Clark JC, Dey CR, Neuman J, Glasser SW, Crapo JD, Chang LY and Whitsett JA (1992) Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury. *J Biol Chem* 267, 23937-23941.

Wolff SP and Dean RT (1987) Glucose autooxidation and protein modification. The potential role of 'autooxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J* 245, 243-250.

Wong A and Cortopassi G (1997) mtDNA mutations confer cellular sensitivity to oxidant stress that is partially rescued by calcium depletion and cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun* 239, 139-145.

Wong YL, Smith CV, McMicken HW, Rogers LK and Welty SE (2001) Mitochondrial thiol status in the liver is altered by exposure to hyperoxia. *Toxicol Lett* 123, 179-193.

-Y-

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P and Kadowaki T (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 7, 941-946.

Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D and Stern D (1994) Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 269, 9889-9897.

Yu BP (1996) Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radic Biol Med* 21, 651-668.

Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW and Shulman GI (2002) Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 277, 50230-50236.

-Z-

Zamzami N, Hirsch T, Dallaporta B, Petit PX and Kroemer G (1997) Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. *J Bioenerg Biomembr* 29, 185-193.

Zenri H, Rodriquez-Capote K, McCaig L, Yao LJ, Brackenbury A, Possmayer F, Veldhuizen R and Lewis J (2004) Hyperoxia exposure impairs surfactant function and metabolism. *Crit Care Med* 32, 1155-1160.

Zhang Z, Apse K, Pang J and Stanton RC (2000) High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase via cAMP in aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 275, 40042-40047.

Zhao W, Devamanoharan PS and Varma SD (2000) Fructose induced deactivation of antioxidant enzymes: preventive effect of pyruvate. *Free Radic Res* 33, 23-30.

Zidenberg-Cherr S, Keen CL, Lonnerdal B and Hurley LS (1983) Dietary superoxide dismutase does not affect tissue levels. *Am J Clin Nutr* 37, 5-7.

Zimmerman JA, Malloy V, Krajcik R and Orentreich N (2003) Nutritional control of aging. *Exp Gerontol* 38, 47-52.

Zoeller RA, Lake AC, Nagan N, Gaposchkin DP, Legner MA and Lieberthal W (1999) Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether. *Biochem J* 338 (Pt 3), 769-776.

Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL and Sollott SJ (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, 1001-1014.

Zweier JL, Duke SS, Kuppusamy P, Sylvester JT and Gabrielson EW (1989) Electron paramagnetic resonance evidence that cellular oxygen toxicity is caused by the generation of superoxide and hydroxyl free radicals. *FEBS Lett* 252, 12-16.

ANNEXES

- Publications -

Garait B, Couturier K, Servais S, Letexier D, Perrin D, Batandier C, Rouanet JL, Sibille B, Rey B, Leverve X, Favier R. *Fat intake reverses the beneficial effects of low caloric intake on skeletal muscle mitochondrial H₂O₂ production.* (2005) Free Radical Biology and Medicine 39:1249-1261.

Gonsolin D, Couturier K, **Garait B**, Rondel S, Novel-Chaté V, Peltier S, Faure P, Gachon P, Boirie Y, Kerié C, Favier R, Pepe S, Demaison L, Leverve X. *High dietary sucrose triggers hypersinsulinemia, increases myocardial β -oxidation, reduces glycolytic flux and delays post-ischemic contractile recovery.* (2006) Molecular and Cellular Biochemistry (sous presse).

Lacraz G, Couturier K, **Garait B**, Taleux N, Servais Sibille B, Leverve X, Favier R. *New insights into caloric intake and its influence on H₂O₂ production by liver mitochondria.* En cours de soumission.

- Communication orale –

Modèles de rat en hyperoxie. Congrès de Nutrition Clinique à tout âge de la vie. SNFEP, GFHGNP, CFGN- Bordeaux (France) 30 nov.-2 déc. 2005.

- Posters -

Garait B, Gauthier MS, Lacraz G, Couturier K, Lavoie JM, Favier R. *Effets d'un régime riche en saccharose sur la production de ROS mitochondrial et influence de l'entraînement.* Congrès du Groupe Français de Bioénergétique – Carry le Rouet (France) 21-24 sept. 2005

Garait B, Couturier K, Batandier C, Leverve X, Favier R. *La réduction du stress oxydant induite par la restriction calorique peut être restaurée par un régime hyperlipidique.* Congrès du Groupe Français de Bioénergétique – Aussois (France) 25-28 sept. 2003.

FAT INTAKE REVERSES THE BENEFICIAL EFFECTS OF LOW CALORIC INTAKE ON SKELETAL MUSCLE MITOCHONDRIAL H₂O₂ PRODUCTION

Blandine GARAIT¹, Karine COUTURIER¹, Stéphane SERVAIS², Dominique LETEXIER², David PERRIN², Cécile BATANDIER¹, Jean-Louis ROUANET², Brigitte SIBILLE², Benjamin REY², Xavier LEVERVE¹, and Roland FAVIER¹

*1/ Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, Equipe Mixte INSERM 221
Université Joseph Fourier, BP 53X – 2280 Rue de la Piscine
38041 Grenoble Cedex 09 –France*

*2/ Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire, UMR 5123 CNRS
Université Claude Bernard Lyon 1- 43, Boulevard du 11 Novembre 1918
69622 Villeurbanne Cedex*

Acknowledgements

This work was supported by a grant from INSERM/INRA (AIP 02 P00275)

Running title: Fat intake and mitochondrial H₂O₂ production

Correspondence:

Roland FAVIER, Dr Sc

Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, Equipe Mixte INSERM 221
Université Joseph Fourier, BP 53X – 2280 Rue de la Piscine
38041 Grenoble Cedex 09 –France

Phone: 00 33 476 51 44 90

Fax: 00 33 476 51 42 18

Mail: roland.favier@ujf-grenoble.fr

FAT INTAKE REVERSES THE BENEFICIAL EFFECTS OF LOW CALORIC INTAKE ON SKELETAL MUSCLE MITOCHONDRIAL H₂O₂ PRODUCTION

ABSTRACT

Food restriction is the most effective modulator of oxidative stress and it is believed that a reduction in caloric intake per se is responsible for the reduced generation of reactive oxygen species (ROS) by mitochondria. Hydrogen peroxide (H₂O₂) generation and oxygen consumption (O₂) by skeletal muscle mitochondria were determined in a peculiar strain of rats (Lou/C) characterized by a self low caloric intake and a dietary preference for fat. These rats were fed either with a standard high carbohydrate (HC) or a high fat (HF) diet and the results were compared to those measured in Wistar rats fed a HC diet. H₂O₂ production was significantly reduced in Lou/C rats fed a HC diet, this effect being not due to a lower O₂ consumption but rather to a decrease in rotenone-sensitive NADH-ubiquinone oxidoreductase activity and increased expression of uncoupling proteins 2 & 3. The reduced H₂O₂ generation displayed by Lou/C rats was accompanied by a significant inhibition of permeability transition pore (PTP) opening. H₂O₂ production was restored and PTP inhibition was relieved when Lou/C rats were allowed to eat a HF diet suggesting that the reduced oxidative stress provided by low caloric intake is lost when fat proportion in the diet is increased.

Key words: self low caloric intake - free radicals - high fat diet – membrane potential – uncoupling proteins – calcium retention capacity

In many species including mammals, reduction in energy intake without malnutrition, is able to reduce the total amount of oxidative stress by altering mitochondrial metabolism thereby delaying the onset of age-related pathologic conditions [1, 2, 3]. However, it has been shown that effects of low energy intake depend on different factors, such as the grade and the duration of energy restriction, the implementation time, and the tissue considered [see review in 3]. Thus, long-term reduction of caloric intake up to 1 year is generally accompanied by a decrease in mitochondrial H_2O_2 production and oxidative damages in rat heart and skeletal muscle [4, 5, 6] whereas in the liver reactive oxygen species (ROS) production was reported either to decrease [7] or not [8]. The effects of short-term caloric restriction (2 weeks to 4 months) on mitochondrial oxidative stress are even more controversial since H_2O_2 production by skeletal muscle mitochondria has been reported to decrease in some case [9] or to remain unchanged [10]. Thus, with the available information it cannot be concluded whether skeletal muscle mitochondrial ROS production decreases or not with caloric restriction. Therefore, we considered of interest to investigate mitochondrial ROS production in a peculiar strain of rats (Lou/C) of Wistar origin [11] which is characterized by a self low caloric intake [12-16]. The most important difference between Lou/C and more common rat strains (Fisher 344, Wistar, Brown Norway) is a shift of preferences from carbohydrate to fat diets with aging [16] and the absence of obesity when fed a high fat diet [15].

The major purpose of the present study was to measure mitochondrial ROS production in Lou/C rats fed with a standard diet rich in carbohydrates (HC) and the results were compared with Wistar rats fed the same diet and with Lou/C allowed to increase their fat intake. Since mitochondrial ROS generation was found to be dependent upon the electron flow through the electron transport chain [ETC, 17-19], H_2O_2 production was evaluated in skeletal muscle mitochondria energized with various substrates providing reducing equivalents to complex I or/and complex II of the ETC. For this purpose, skeletal muscle mitochondria were energized either with glutamate/malate (providing NADH) and/or succinate (generating $FADH_2$) as substrates. Finally, we examined the role of ROS on mitochondrial permeability transition that has been shown to be implicated in the control of

apoptosis [20]. Indeed, the regulation of permeability transition pore (PTP) opening in skeletal muscle mitochondria is modulated by electron flow through the complex I of the ETC [21] and the role of apoptosis in various tissues has been highlighted during normal aging [22] whereas Lou/C rats are suspected to display delayed aging [13].

MATERIAL AND METHODS

Animals and Experimental design

Four to five month-old male Lou/C and Wistar rats bred in our animal room facilities were caged individually and maintained at 22 ± 1 °C, 12h:12h light: dark conditions, and $50 \pm 10\%$ relative humidity. Lou/C rats were divided into two groups, the first one (Lou/C-HC) being maintained on a standard high carbohydrate (HC) rat chow (UAR AO3, Villemoisson, France) while the other group (Lou/C-HF) had the choice between the standard chow and a high fat diet (HF, table 1) which were both provided *ad libitum* in stainless steel hanging cages. Body weight and food intake were recorded thrice weekly and fresh food was provided at the same time to ensure minimal disturbance to the animals' food behavior. Animals were cared for in accordance with guidelines from the French Ministère de l'Agriculture and the European Convention for the protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Scientific purposes (Council of Europe N° 123, Strasbourg, 1985).

Whole body oxygen consumption-Locomotor activity

Energy expenditure (EE) of individual Wistar and Lou/C-HC rats was monitored by indirect calorimetry as described previously [23]. Fractional concentrations of O₂ and CO₂ were measured using a paramagnetic analyzer (Servomex OA184) and an infrared gas analyzer (Servomex series 1400), respectively. Air flow rate was obtained from a Platon SDF 2044 flow meter. Data were collected online and processed with Labetech-Notebook software. Rats were placed individually in the respiration chamber early in the morning until the next mid-day so that the measurement last 24 hours with at least 4 hours of measurement before for rat habituation. Total EE (TEE) was calculated on a hourly basis and EE during the dark phase (EE_{dark}) was calculated between 19:00 h and 07:00 h. During data collection, rats

were fed *ad libitum* and kept on the same photoperiod and temperature than in the animal room facility.

Locomotor activity from Wistar and Lou/C-HC rats was measured with a Digiscan Animal Activity Monitor system (Omnitech Electronics Inc., Columbus, OH, U.S.A.) which monitored the horizontal (back and forth; right and left) and vertical (rearing) movements of the animals. The Digiscan analyser was interfaced with an IBM-PC compatible computer using Digipro software. The individual compartments (L=20; W=20; H=30 cm) were put in a dimly lit and quiet room. Horizontal i.e. locomotion and vertical movements i.e. rearing were expressed as a number of beams crossed over 24h of testing.

Sacrifice and tissue sampling

Rats were sacrificed by cervical dislocation for the collection of tissues and blood. Serum was extracted and flash frozen in liquid nitrogen. Quadriceps from both legs were quickly excised, fat was eliminated, and the tissue was rinsed, and chopped into isolation medium (150 mM sucrose, 75mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM KH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 7.4). Muscle pieces were transferred to 30 ml of isolation medium supplemented with 0.2% bovine serum albumin (BSA) and 0.2mg/ml protease (Sigma-Aldrich, l'Isle d'Abeau, France). After standing for 1 min, muscles were homogenized using motor-driven Potter-Elvehjem, transferred to 60ml of isolation medium supplemented with 0.2% BSA. Nuclei and cell debris were removed by centrifugation at 800 g for 10 min. Mitochondria were isolated from the supernatant by spinning twice at 8,000g for 10 minutes. The mitochondrial pellet was resuspended in 0.5ml of isolation buffer without BSA and kept on ice. Mitochondrial protein was measured by the bicinchoninic acid (BCA) method (Pierce, Rockford, Illinois). The final mitochondrial suspensions were maintained over ice and were used for measurements of oxygen consumption, free radical production, and calcium retention capacity. Enzymatic activity of complex I, II, and IV of the ETC was determined later on frozen (-80°C) mitochondrial suspensions.

Mitochondrial Oxygen Consumption

The rate of mitochondrial oxygen consumption was measured at 30°C in an incubation chamber with a Clark-type O₂ electrode filled with 2 ml of incubation medium (125 mM KCl,

10 mM Pi-Tris, 20mM Tris-HCl, 0.1 mM EGTA, pH 7.2). All measurements were performed using mitochondria (0.2 mg mitochondrial protein/ml) incubated either with glutamate (5mM)/malate (2.5 mM) or/and succinate (5 mM) as substrates, in the presence (State 3) and in the absence (State 4) of 100 μ M ADP. The incubation medium was constantly stirred with a built-in electromagnetic stirrer and bar flea. The efficiency of the mitochondrial oxidative phosphorylation was assessed by the state 3/state 4 ratio which measures the degree of control imposed on oxidation by phosphorylation (respiratory control ratio, RCR).

Measurement of mitochondrial membrane potential

The mitochondrial membrane electrical potential ($\Delta\Psi$) was determined simultaneously with oxygen consumption using the potential-dependent triphenylmethyl phosphonium cation (TPMP⁺) probe [24]. Mitochondria (0.35 mg protein ml⁻¹) were incubated at 30°C in assay medium containing 5 μ M rotenone, 1 μ g/ml oligomycin and 65 ng/ml nigericin (to convert most of the pH component of Δp to membrane potential units (mV), allowing Δp to be measured in mV units. The TPMP⁺ electrode was calibrated with sequential additions of up to 2 μ M TPMP⁺, and 4 mM succinate was added to start the reaction. Respiration and membrane potential were inhibited progressively through successive additions of malonate up to 3 mM. At the end of each run, 0.4 μ M FCCP was added to dissipate the membrane potential and release all TPMP⁺ back into the medium, allowing correction for any small electrode drift. The matrix volume of skeletal muscle mitochondria was assumed to be 2 μ l.mg⁻¹ protein.

Mitochondrial Oxygen Radical Production

The rate of mitochondrial production of reactive oxygen species (ROS) was measured at 30°C following the linear increase in fluorescence (excitation at 312 nm, emission at 420 nm) due to enzymatic oxidation of homovanillic acid by H₂O₂ in the presence of horseradish peroxidase [25], modified to kinetically follow the rate of production of H₂O₂ by isolated mitochondria [26] on a SFM25 computer-controlled Kontron fluorometer. Reaction conditions were 0.2 mg of mitochondrial protein/ml, 6U/ml of horseradish peroxidase, 0.1 mM homovanillic acid, with glutamate/malate or/and succinate (in the same concentrations as in oxygen consumption assays) added to start the reaction. The same incubation buffer was used as for measurements of mitochondrial oxygen consumption. Mitochondrial ROS was

measured both in the absence (State 4) and in the presence (State3) of 100 μ M ADP. When ROS production returned to basal after all ADP was used (state 4), 2 μ M rotenone and 2 μ M antimycin A were sequentially added to determine respectively, the maximum rate of H₂O₂ production of complexes I and I+III, of the respiratory chain.

Calcium retention capacity

Sensitivity of the Permeability Transition Pore (PTP) was evaluated by determining calcium retention capacity of mitochondria incubated with the same buffer used for oxygen consumption except that the incubation medium was supplemented with 1 μ M Calcium Green-5N [21]. Respiratory substrates were the same as for oxygraphic measurements (glutamate/malate and/or succinate) and pulses of 10 μ M Ca²⁺ were added every minute until pore opening. Specificity of mitochondrial pore opening was assessed by adding 1 μ M cyclosporin A (CsA).

RNA concentration of UCP2 and UCP3 in skeletal muscle

Total RNA were extracted from quadriceps samples (80 mg) using Tri Reagent® (Euromedex). Concentration and purity were verified by measuring optimal density at 260 and 280 nm. Their integrity was checked by 1% agarose gel electrophoresis (Eurobio). UCP2 and UCP3 mRNA concentrations were measured by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using β actine as reference. Primer sequences are shown in table 1. For each target mRNA, a RT was performed from 0.1 μ g of total RNA with 100 U of M-MLV Reverse Transcriptase (Promega), 5 μ L of M-MLV RT 5X buffer, 20 U of RNasin Ribonuclease Inhibitor, 12 pmoles of deoxynucleoside triphosphate and 15 picomoles of the specific antisense primer, in a final volume of 25 μ L. The reaction consisted in 5 min at 70°C (RNA and antisense primer), then 60 min at 42°C (all mix) followed by 15 min at 70°C. After chilling, 5 μ L were used for PCR reaction. The 5 μ L of RT medium were added to 45 μ L of PCR mix (5 μ L 10X REDTaq PCR buffer) containing 6 picomoles of MgCl₂, 8 picomoles of deoxynucleoside triphosphate, 2.5 U of REDTad DNA polymerase (Sigma), 15 picomoles of corresponding antisense primers and 22.5 picomoles of sense primers. The PCR conditions were: 2 min at 94 °C followed by 28 cycles, 35 cycles or 18 cycles for UCP3, UCP2 and β actin respectively (1 cycle = 1 min at 94°C, 1 min at 60°C, 1 min at 72°C). PCR was ended

by 10 min at 72°C. Products were analysed on 2% agarose gel prestained with ethidium bromide. For quantitation of relative bands intensities, pictures were taken with a Camera DC120 (Kodak) and the ratio of each target to β actine was determined for each sample with Kodak Digital Science 1D 2.0 (Kodak Scientific Imaging System).

Primer sequences used for RT-PCR

	Sense (5' $\rightarrow$ 3')	Antisense (5' $\rightarrow$ 3')	Size (bp)
β actin (gi11420427)	<i>GAC GAG GCC CAG AGC AAG AGA</i>	<i>GGG TGT TGA AGG TCT CAA ACA</i>	225
UCP2 (gi9507230)	<i>ACA AGA CCA TTG CAC GAG AG</i>	<i>CAT GGT AAG GGC ACA GTG AC</i>	295
UCP3 (gi48675842)	<i>ATG CAT GCC TAC AGA ACC AT</i>	<i>CTG GGC CAC CAT CCT CAG CA</i>	314

Enzymatic activities

Measurement of the specific activity of complex I, II and IV of the respiratory chain was performed spectrophotometrically. A total of 8-10 μ g of mitochondrial proteins were required to determine the activity of complex I and II, and only 4 μ g were used for complex IV. Assays were performed at 37°C in a total volume of 1ml, and enzyme activity was expressed as nmoles of reduced or oxidized substrate/min⁻¹/mg of mitochondrial protein.

Measurement of complex I (rotenone-sensitive NADH-ubiquinone oxidoreductase, EC 1.6.99.3): Assay was performed using decylubiquinone (100 μ M) as acceptor and NADH (200 μ M) as a donor, in a 10mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ buffer (pH 7.5) and BSA (3.75mg/ml), in the presence of KCN (2mM) and antimycin A (7.5 μ M). The oxidation of NADH was then measured at 340nm, and the addition of rotenone (4 μ M) allowed the quantification of the rotenone-sensitive activity, which is characteristic of complex I.

Measurement of complex II (succinate-ubiquinone reductase, EC 1.3.99.1): Succinate-ubiquinone oxidoreductase activity was quantified by measuring the decrease in UV absorbance due to the reduction of DCPIP (100 μ M) at 600 nm. The measurement was

performed in a medium with 50mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7.5) in the presence of decylubiquinone (100 μM) rotenone (2 μM) and KCN (2mM).

Measurement of complex IV (cytochrome c oxidase, EC 1.9.3.1): Assay was performed at 550nm measuring cytochrome c (100 μM) oxidation in a 50mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ buffer (pH 7.0).

Citrate synthase activity was determined as described previously [12]. Total plasmatic concentrations of thyroid hormones; triiodothyronine (T3) and tetraiodothyronine (T4) were measured with a radioimmunoassay (Beckman Coulter, Villepinte, France).

Statistical analysis

All data are reported as means $\pm$ SEM. Statistical comparisons were done using a one- or a two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated or non-repeated measures as applicable. The Fisher least significant difference post hoc test was used to identify specific mean differences ($P < 0.05$).

RESULTS

Body growth and food intake

When fed with a standard (high carbohydrate, HC) diet, Lou/C rats displayed a stunted growth due to self-caloric restriction (Fig 1). Indeed Lou/C rats have a spontaneous 35-40% lower caloric intake than Wistar rats (2355 ± 88 Kcal vs 3763 ± 53 Kcal during the entire period of experiment for Lou/C and Wistar, respectively). When Lou/C rats were allowed to choose between standard (HC) and high fat (HF) diets, these rats increased their caloric intake during the first week reaching a level similar to Wistar rats (Figure 1). Nevertheless, during the subsequent weeks, caloric intake of Lou/C-HF over the entire period of experiment averaged 2317 ± 63 Kcal a value close to that measured in Lou/C-HC. It has to be mentioned that adult Lou/C-HF rats had a strong preference for fat which represented approximately 40% of the total caloric intake (Fig 1), this increase being compensated for by a lower carbohydrate intake that decreased from 60% to ~15% of the caloric intake.

Energy expenditure - Locomotor activity -Thyroid status

Figure 2A summarizes the results of whole body oxygen (O₂) consumption, adjusted for body mass^{0.75} and collected over a 24-h period. O₂ consumption was significantly higher for Lou/C (3.95 ± 0.10 W/h/kg^{0.75}) than Wistar (3.49 ± 0.13 W/h/kg^{0.75}) rats. Interestingly, the difference in energy expenditure between strains was more pronounced during the light (~16%) than the dark (~8%) period. In addition Lou/C rats displayed a greater locomotor activity both during the light and dark period (Figure 2B). Because energy expenditure is clearly dependent on thyroid status, we evaluated the circulating levels of triiodothyronin (T3) and thyroxin (T4) in these rats but neither T3 (4.8 ± 0.8 and 5.3 ± 0.3 pg/ml) nor T4 (17.3 ± 1.7 and 20.6 ± 1.0 pg/ml) were different between Lou/C and Wistar rats.

Effects of respiratory substrates on mitochondrial H₂O₂ production

In Wistar rats, , the rates of H₂O₂ production of mitochondria during state 4 was clearly dependent upon the substrates provided to mitochondria (Fig.3). Thus, the amount of H₂O₂ generated with complex I-linked substrate (glutamate/malate, Fig 3A) was less than 10% of the amount of H₂O₂ produced with succinate (providing FADH₂ to complex II, Fig 3B). When mitochondria were incubated simultaneously with glutamate/malate and succinate (Fig 3C), then ROS production was significantly reduced as compared to succinate alone.

The low rate of H₂O₂ production with glutamate/malate was significantly increased by adding rotenone to reach 92 ± 13 pmole H₂O₂/min/mg protein in Wistar rats, a rate that was increased further by adding antimycin to reach a level that was approximately twice that measured with rotenone (Fig.3A). These results indicate that the forward electron flow through complex I can generate H₂O₂ when it is fully reduced and inhibited by rotenone, but that the rate is very low when the complex I is not inhibited by rotenone. Mitochondrial H₂O₂ generation by complex I through a reverse electron flow can also be observed by incubating mitochondria with succinate in absence of rotenone (Fig.3B). Whereas mitochondrial ROS production was totally abolished by addition of ADP (active respiration or state 3) with succinate alone, the rate of H₂O₂ generation is only reduced by half when mitochondria were energized with glutamate/malate and succinate simultaneously (Fig.3C).

During state 4, H_2O_2 production by Lou/C-HC mitochondria energized with glutamate/malate was similar to the rate measured in Wistar rats (Fig 3A). In contrast, ROS production by Lou/C-HC was drastically reduced (halved) when the mitochondria were respiring on succinate alone (Fig 3B) or in combination with glutamate/malate (Fig 3C). The low H_2O_2 production rate by Lou/C-HC mitochondria was due to a reduced H_2O_2 generation at both complex I (through the reverse electron flow) and complex III as evidenced by a) the drastic lower H_2O_2 production following addition of rotenone to mitochondria energized with succinate; and b) the lower H_2O_2 production by mitochondria incubated with glutamate/malate in presence of antimycin A (a specific inhibitor of complex III of the ETC).

The reduction in mitochondrial ROS production reported in Lou/C-HC was totally abolished by allowing these rats to eat the high fat diet whether the mitochondria were respiring on glutamate/malate and succinate alone or in combination. Basically, the rate of H_2O_2 production in Lou/C-HF were similar to those measured in Wistar fed the standard HC diet.

Mitochondrial oxygen consumption (Table 2)

The rate of oxygen (O_2) consumption by mitochondria incubated with glutamate/malate before ADP addition was significantly smaller than with succinate alone or in combination (data not shown). Addition of ADP was accompanied by a significant increase in O_2 consumption (active State 3) that was similar whether the mitochondria were incubated with glutamate/malate or succinate alone. Nevertheless, O_2 consumption was significantly greater when both substrates were provided simultaneously to isolated mitochondria.

Addition of oligomycin (to inhibit of F₀-F₁ ATPase) allowed to measure basal O_2 consumption (state 4, non phosphorylating conditions) and to calculate the respiratory control ratio (Table 2). High RCR, indicating the good quality of our mitochondrial preparations was significantly greater with glutamate/malate (~ 20) than succinate (~ 6) or glutamate/malate + succinate (~ 8), but there were no difference between Wistar and Lou/C whether fed with the HC or the HF diet.

Mitochondrial proton conductance – UCP3 expression

Figure 4 shows the kinetic response of the proton leak rate to its driving force, the membrane potential, in mitochondria isolated from quadriceps muscle. Under control conditions (without palmitate), skeletal muscle mitochondria exhibited the characteristic non-linear response of proton leak to membrane potential, the proton conductance being similar in Lou/C-HC and Wistar rats. However, in presence of UCP3 activator (palmitate), Lou/C displayed higher respiration rate at membrane potential between 137 to 173 mV. The increase in proton conductance was prevented by addition of GDP, indicating that it was dependent on UCP3 activation by palmitate. UCP3 and UCP2 mRNA were significantly higher in Lou/C-HC rats (Figure 5). On the other hand, high fat diet enhanced UCP3 expression whereas UCP2 content was similar in Lou/C-HC and Lou/C-HF.

Enzymatic activities of the electron transport chain

Table 3 shows the activity of three separate enzymatic complexes of the respiratory chain measured in vitro. Both complex I (NADH ubiquinone reductase) and complex II (succinate dehydrogenase) were significantly reduced in Lou/C-HC. In contrast complex IV (cytochrome oxidase) or citrate synthase (matrix enzyme) from these rats were not affected at all. NADH ubiquinone reductase activity was totally restored by feeding Lou/C rats with the HF diet. In addition, such a diet was accompanied by a significant increase in citrate synthase activity.

Effects of respiratory substrates on permeability transition pore (PTP) opening induced by Ca^{2+} loading

The experiments reported in Fig. 6 were performed in order to directly measure the Ca^{2+} retention capacity (Ca-RC) of skeletal muscle mitochondria with different energy sources. In Wistar rats, when energized with succinate + rotenone, skeletal muscle mitochondria displayed a Ca-RC capacity which was 2-3-fold higher than that observed when they were energized with glutamate/malate. When mitochondria were incubated with glutamate/malate and succinate simultaneously, Ca-RC increased significantly to a level that was 50% higher than with glutamate/malate alone. Ca-RC was significantly higher in Lou/C-HC whether the mitochondria were energized with succinate or G/M alone or in combination.

On the other hand, when Lou/C rats were fed the HF diet, Ca-RC was not different from that measured in Wistar fed the HC diet.

As expected, addition of 1 μ M of cyclosporin A (CsA) increased the Ca-RC with both G/M and succinate (data not shown). However, even in the presence of CsA, Ca-RC remained higher when mitochondria were energized with succinate.

DISCUSSION

Mitochondrial ROS production by skeletal muscle mitochondria

The sites of mitochondrial ROS production have been extensively explored since the pioneer work of Boveris and Chance [17]. Two principal sites of ROS generation have been identified in mitochondria, complex I and complex III of the ETC, the relative importance of each complex varying with experimental conditions and between tissues and species [26]. In the present study, we found that the rate of ROS production by muscle mitochondria respiring on glutamate/malate (G/M) was much lower than the rate measured with succinate (Figure 3). Recently, Sanz et al [27] have shown that mitochondrial ROS production with G/M was much higher than with pyruvate/malate (P/M) even though both G/M and P/M provided NADH to complex I of the ETC. However, it must be kept in mind that in addition to serving as a natural fuel for mitochondria, pyruvate is also a potent antioxidant capable of neutralizing hydrogen peroxide and bolstering intracellular antioxidant defenses [28]. It is thus possible that ROS production measured with P/M [5] was somewhat affected by the antioxidant properties of pyruvate. The addition of rotenone to mitochondria respiring on pyruvate/malate [19] or glutamate/malate (Figure 3) induced a significant increase in ROS production that indicates that complex I in skeletal muscle can generate superoxide when it is fully reduced and inhibited by rotenone, but that the rate measured when the complex I is not inhibited by rotenone is very low. Nevertheless, we found that, in absence of inhibitors, skeletal muscle mitochondria produced significant amount of ROS when respiring on G/M + succinate (Figure 3). This suggests that the simultaneous oxidation of NADH and FADH₂ by skeletal muscle mitochondria is accompanied by significant ROS production.

In agreement with previous studies [18, 19, 29] we found that the majority of ROS produced by mitochondria are due to the reversed electron transport through complex I, as evidenced by the 85-90% reduction after rotenone addition to mitochondria energized with succinate alone or in combination with G/M (Figure 3). Nevertheless a minor portion of ROS is generated at complex III (as evidenced by the increase in H₂O₂ production by adding antimycin A). Succinate-supported ROS production of mitochondria is stopped after the addition of sufficient ADP to cause the transition from the resting state to the respiratory active state 3 (Figure 3). This finding generated the widespread notion that mitochondria only produce free radicals in resting state 4 conditions [17, 18, 30]. However, ROS production by mitochondria respiring on G/M + succinate was only reduced by half after ADP addition, providing evidence for ROS generation during active respiration (Figure 3). It is well established that the rate of mitochondrial free radical production is linked to the degree of reduction of the respiratory chain electron carriers and/or to $\Delta\Psi$, the transmembrane electric potential difference [17, 31]. Indeed, treatment of succinate and/or G/M supplemented mitochondria with different uncouplers (pentachlorophenol, FCCP, or CCP) stopped free radical production [17, 31].

Caloric intake and mitochondrial ROS production by skeletal muscle

As recently reviewed by Merry [1], the primary adaptive response to caloric restriction may be a reduction in mitochondrial ROS generation, the up-regulation of scavenging and repair enzymes systems being a secondary responses to the feeding regime. One explanation for the reduced production of ROS by calorie-restricted animals was based on the assumption of a lower metabolic rate and mitochondrial oxygen consumption that decreases the rate of electron flow through the ETC [2]. However, in a careful study of energy metabolism during caloric restriction, it was shown that the reduction of metabolic rate by food restriction was a transient phenomenon so that chronic caloric restriction does not lead to a decrease in metabolic rate per unit metabolic mass [32]. In contrast, Bevilacqua et al [9] reported a significant reduction (-40%) in mass-adjusted whole body O₂ consumption after 6-mo of caloric restriction. In the present study, we found that Lou/C-HC rats (Fig. 2A) displayed

significantly higher energy expenditure likely due to their locomotor hyperactivity (Figure 2B).

To determine the effects of low caloric intake on mechanisms of cellular energy expenditure, we focused on the mitochondrial oxidative phosphorylation system and, more specifically on mitochondrial leak, a major contributor to basal cellular oxygen consumption [33]. However, mitochondrial O₂ consumption in non phosphorylating conditions (state 4) was not different in Wistar and Lou/C rats (Table 2). This was confirmed by the similar kinetics of proton leak in control conditions (Figure 4A). Nevertheless, when mitochondria were incubated in presence of palmitate (Fig 4B), a well known activator of UCP3 [34], O₂ consumption was significantly higher (25-50%, $p < 0.01$) in Lou/C rats between 135 and 173mV (see insert Fig4B). Interestingly, the palmitate-induced increase in O₂ consumption was inhibited by GDP (Figure 4C) suggesting that proton leak can be affected by UCP activation [34].

Numerous studies have examined the effects of caloric restriction on ROS production by mitochondria but the results appear to depend on different factors, such as the grade and the time of restriction, and the tissue examined [9, 26, 30]. Concerning skeletal muscle, an initial investigation [6] reported a decrease in superoxide production after long-term caloric restriction (CR). In contrast, two recent studies [9, 10] reported contrasting results: in one case, caloric restriction for 12 mo tended to reduce the levels of H₂O₂ production in the muscle [10] while in the other [9], ROS generation was reduced after only two weeks of caloric restriction and remained abated with prolongation of caloric restriction up to 6 mo. Thus, prolonged CR time periods would be needed to observed statistical significant decrease in skeletal muscle. In our case, the mitochondrial ROS production was determined on 5-6 month-old Lou/C rats, i.e. at a time where mitochondrial H₂O₂ production by calorie-restricted rats was reported to be either marginally decreased [10] or drastically reduced [9]. The reasons for such discrepant results in response to caloric restriction are not readily apparent but could be due to the particular strain of rats used in these studies. Indeed, recently it was shown that peptide-hormone levels regulating food intake and energy balance in

response to fasting were clearly different between Wistar, Fisher-344, Brown Norway and Lou/C [14].

The low rate of H_2O_2 production by Lou/C-HC mitochondria could be due to various mechanisms. This could be due to a capacity of Lou/C mitochondria to maintain a lower degree of reduction of the complexes I and III generators in the steady state. Nevertheless, additional mechanisms must be involved since addition of rotenone or antimycin A to G/M-supplemented mitochondria, treatments which strongly increase the degree of reduction of complexes I and III, did not abolish the difference in ROS production between Lou/C-HC and Wistar rats (Figure 3). A second reason for a low free radical generation could be a lower mitochondrial oxygen consumption of Lou/C-HC in relation to Wistar mitochondria. Indeed, respiratory rate was slightly but significantly reduced in Lou/C-HC as compared to Wistar with mitochondria energized with G/M but not with succinate (Table 2). An inhibition of complex I of the ETC from Lou/C-HC was confirmed by the decrease of NADH ubiquinone reductase activity (Table 3). A similar mechanism has been proposed to explain the low rate of H_2O_2 production by bird mitochondria as compared to mammals [26]. Furthermore, we recently reported that mitochondrial ROS production is drastically lowered by dimethylbiguanide (metformin) through a mild inhibition of the respiratory chain complex I [Batandier C., personal communication, 35]. Alternatively, mitochondrial ROS generation can be modulated by uncoupling proteins [36]. Uncoupling has been proposed as particularly important in protecting against ROS under conditions where ATP generation is not essential (state 4), thereby directing electron transport toward uncoupling or alternatively to work independent of ATP [37]. In the present study, we found that expression of UCP3 (muscle specific uncoupling protein) was significantly increased in skeletal muscle Lou/C rats (Figure 5). The direct effects of UCP3 on mitochondrial ROS generation in Lou/C rats are difficult to assess, but we found that incubating isolated mitochondria with palmitate resulted in an increased proton leak (Figure 5), this effect being inhibited by GDP, a nucleotide known to inhibit UCP-induced uncoupling. It is thus conceivable that the moderate increase in UCP3 mRNA observed in Lou/C rats was sufficient to reduce H_2O_2 production (Figure 3).

Fat intake and mitochondrial ROS production by skeletal muscle

A high fat diet has been shown to adversely affect the health of various animal species including humans [38]. Even though high levels of unsaturated fat were found to increase oxidative stress and to decrease antioxidative enzyme activity [39], energy restriction was reported to reduce tumor incidence even with high fat diet [40], suggesting that oxidative stress linked to high fat intake can be modulated by adjusting caloric intake. In the present study, we found that, most of the differences in mitochondrial ROS production between Wistar and Lou/C rats were totally abolished when Lou/C rats were allowed to increase fat intake (Figure 2). Indeed, this peculiar strain of rats displays a strong preference for fat (Figure 1) in agreement with previous reported data [16]. It appears that Lou/C rats are able to adjust caloric intake to their real energy or metabolic needs except for the first week of diet self-selection (Figure 1). Therefore, we are rather confident in postulating that the changes in mitochondrial free radical generation observed in Lou/C HF were due to a large fat intake and not to an increased caloric intake. From the data reported in Figure 3, it can be concluded that the increased rate of H_2O_2 generation occurred mainly at the level of complex I of the ETC through the reversed electron transport since it can be drastically reduced by adding rotenone to mitochondria respiring either on succinate or succinate and G/M. Furthermore, free radical generation from complex III was enhanced by increasing fat intake as evidenced by the large H_2O_2 production measured with G/M in presence of antimycin A. Changes in free radical generation with high fat intake were accompanied by an increase in oxygen consumption by mitochondria from Lou/C-HF incubated with glutamate/malate but not with succinate or glutamate/malate/succinate (Table 2). In conjunction with the restoration of mitochondrial oxygen consumption and ROS generation by increasing fat intake, we found that the enzymatic activity of the complex I of the respiratory chain was enhanced by HF diet (Table 3) to a level similar to that measured in Wistar rats. These results suggest that not only quantitative but qualitative changes in the diet affect mitochondrial ROS production in such way that the beneficial effects provided by caloric restriction can be offset by increasing the proportion of fat in the diet. This suggestion is somewhat supported by a recent study showing that protein restriction without strong caloric restriction decrease mitochondrial ROS

production [27]. Although a general consensus was reached in the last decade for a determinant role of caloric restriction in reducing oxidative stress, our data provided evidence that variations in fat could also affect mitochondrial ROS generation in spite of reduced caloric intake. On the other hand, it has been shown that superoxide generation by mitochondria leads to activation of UCP3 [41] but so far, the influence of sustained endogenous ROS generation on UCP3 expression has never been evaluated. In the present study, we found that UCP3 mRNA was significantly increased by high fat diet. Nevertheless, the increased expression of UCP3 in skeletal muscle from Lou/C-HF was not sufficient for reducing mitochondrial H₂O₂ generation (Figure 3).

Permeability transition pore (PTP) opening in skeletal muscle mitochondria

When respiring in the presence of inorganic phosphate and external adenine nucleotides, mitochondria take up Ca⁺⁺ that can be retained indefinitely. But in the absence of adenine nucleotides, the accumulated Ca⁺⁺ is subsequently released with other matrix solutes. This phenomenon has been identified and generally referred to as PTP opening [42]. The physiological significance of PTP opening remains obscure until the active involvement of mitochondria in apoptosis was proposed [20, 42]. With respect to skeletal muscle mitochondria, Fontaine et al [21] have provided evidence for a modulation of PTP opening by electron flow through complex I of the ETC. In the present study, we found that calcium retention capacity (Ca-RC, i.e. the maximal amount of Ca⁺⁺ that can be trapped by mitochondria before opening of the PTP) was significantly greater when mitochondria were energized with succinate than G/M (Figure 6) in agreement with previous reported data [21]. To our knowledge, the present study is the first showing that in presence of both G/M and succinate, Ca-RC was significantly higher than with G/M but remained lower than with succinate. It has been shown that the sensitivity of PTP is directly related to the rate of electron flow through complex I [21]. However in the present study, we found that the rate of electron flow through the ETC (as assessed from the rate of mitochondrial oxygen

consumption) was significantly higher with G/M + succinate than with succinate alone whereas Ca-RC was significantly lower with G/M + succinate than with succinate alone (Figure 3). These data suggest that sensitivity of pore opening does not depend exclusively on electron flow through the ETC. It has been suggested that ROS are involved in the stimulation of mitochondrial permeability transition [20, 43]. In the present study, we found that ROS production by mitochondria energized with G/M and succinate was significantly lower than with succinate alone (Figure 3) and at the same time Ca-RC dropped by 40 to 50% (Figure 6). A close relationship between ROS production and Ca-RC was further supported by the data obtained on Lou/C-HF displaying enhanced H₂O₂ production and Ca-RC to levels similar to those measured in Wistar (Figures 2 and 3). During the last few years, many papers provided evidence for a role of the mitochondrial permeability transition pore in controlling cell death (see e.g. review in [42]) in some postmitotic tissues (e.g. heart, skeletal muscle and brain). Therefore, the higher Ca-RC measured in skeletal muscle mitochondria from Lou/C rats when fed a standard diet might explain the lower incidence of severe pathologies and the greater longevity displayed by this strain of rats [13].

In conclusion, this study showed that the rate of H₂O₂ production by skeletal mitochondria is drastically reduced in Lou/C rats, an inbred strain of rats of Wistar origin [11] characterized by low caloric intake [12-16]. The decrease in mitochondrial ROS production occurs at both complex I and complex III of the ETC and is not linked to a reduction in whole body oxygen consumption. The low ROS production by Lou/C muscle mitochondria is likely due to a reduced activity of complex I of the ETC (the major site of H₂O₂ production within mitochondria) and to enhanced expression of UCP3/UCP2. The reduced H₂O₂ production by Lou/C rats was accompanied by a significant inhibition of permeability transition pore (PTP) opening. Nevertheless, H₂O₂ production was restored and PTP inhibition was relieved when Lou/C rats were allowed to eat a HF diet suggesting that the protection from oxidative stress provided by low caloric intake is lost when the proportion of fat in the diet is elevated.

Acknowledgements

This work was partly supported by a grant from INSERM/INRA (AIP 02 P00275)

REFERENCES

1. Merry, B.J. Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity. *Int.J. Biochem. Cell Biol.* **34**: 1340-1354; 2002.
2. Sohal, R.S.; Weindruch, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* **273**, 59-63; 1996.
3. Yu, BP. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Rad. Biol. Med.* **21**: 651-658; 1996.
4. Gredilla, R.; Lopez-Torres, M.; Barja, G. Effect of time of restriction on the decrease in mitochondrial H₂O₂ production and oxidative DNA damage in the heart of food-restricted rats. *Microsc. Res. Tech.* **59**: 273-277; 2002
5. Gredilla, R.; Sanz, A.; Lopez-Torres, M.; Barja, G. Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J.* **15**, 1589-91; 2001.
6. Lass, A. ; Sohal, B.H. ; Weindruch, R. ; Forster, M.J. ; Sohal, R.S. Caloric restriction prevents age-associated accrual of oxidative damage to mouse skeletal muscle mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **25**:1089-97; 1998.
7. Lopez-Torres, M.; Gredilla, R., Sanz, A., Barja, G. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **32**: 882-889 ; 2002.
8. Ramsey, J.J.; Hagopian, K.; Kenny, T.M.; Koomson, E.K.; Bevilacqua, L.; Weindruch, R.; Harper, M.E. Proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria from energy-restricted rats. *Am. J. Physiol.* **286**: E31-E40; 2004.
9. Bevilacqua, L.; Ramsey, J.J.; Hagopian, K.; Weindruch, R.; Harper, M.E. Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production. *Am. J. Physiol.* **286**: E852-E861; 2004.
10. Drew, B.; Phaneuf, S.; Dirks, A.; Selman, C.; Gredilla, R.; Lezza, A.; Barja, G.; Leeuwenburgh, C. Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Am. J. Physiol.* **284**: R474-R480; 2003.

11. Becker, A.; Bazin, H. Incidence of spontaneous ileocecal immunocytomas in hybrids of Lou/C rats and rat strains with low spontaneous tumor incidence. *J. Natl. Cancer Inst.* **60**: 1505-1508; 1978.
12. Couturier, K.; Servais, S.; Koubi, H.; Sempore, B.; Sornay-Mayet, M.H.; Cottet-Emard, J.M.; Lavoie, J.M.; Favier, R. Metabolic characteristics and body composition in a model of anti-obese rats (Lou/C). *Obes. Res.* **10**: 188-195; 2002.
13. Alliot, J. The Lou/C/jall rats as an animal model of healthy aging. *J. Gerontol.* **57A**: B312-B320; 2002.
14. Kappeler, L.; Zizzari, P.; Grouselle, D.; Epelbaum, J.; Bluet-Pajot, M.T. Plasma and hypothalamic peptide-hormone levels regulating somatotroph function and energy balance in fed and fasted states: a comparative study in four strains of rats. *J. Neuroendocrinol.* **16**: 980-988; 2004.
15. Helies, J.M. ; Diane, A. ; Langlois, A. ; Larue-Achagiotis, C. ; Fromentin, G. ; Tome, D. ; Mormede, P.; Marissal-Arvy, N. Comparison of fat storage between Fischer 344 and obesity-resistant Lou/C rats fed different diets. *Obes. Res.* **13**: 3-10; 2005.
16. Veyrat-Durebex, C.; Alliot, J. Changes in pattern of macronutrient intake during aging in male and female rats. *Physiol. Behav.* **62**:1273-1278; 1997.
17. Boveris, A.; Chance, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* **134**, 707-716; 1973.
18. Barja, G. The quantitative measurement of H₂O₂ generation in isolated mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **34**: 227-233; 2002.
19. St-Pierre, J.; Buckingham, J.A.; Roebuck, S.J.; Brand, M.D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* **277**, 44784-44790; 2002.
20. Kroemer, G.; Zamzani, N., Susin, S.A. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol.Today* **18**: 44-51; 1997.

21. Fontaine, E.; Eriksson, O.; Ichas, F.; Bernardi P. Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* **273**: 12662-12668; 1998.
22. Pollack, M.; Phaneuf, S.; Dirks, A.; Leeuwenburgh, C. The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle , and heart. *Ann. NY Acad. Sci.* **959**, 93-107; 2002.
23. Barre, H.; Cohen-Adad, F.; Duchamp, C.; Rouanet J.L. Multilocular adipocytes from muscovy ducklings differentiated in response to cold acclimation. *J. Physiol.* **375**: 27-38; 1986.
24. Kamo, N.; Muratsugu, M.; Hongoh, R.; Kobatake, Y. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J. Membr. Biol.* **49**:105-121; 1979.
25. Ruch, W.; Cooper, P.H.; Baggiolini, M. Assay of H₂O₂ production by macrophages and neutrophils with homovanillic acid and horse-radish peroxidase. *J. Immunol. Methods* **63**, 347-357; 1983.
26. Barja, G. Mitochondrial free radical production and aging in mammals and birds. *Ann N Y Acad Sci* **854**: 224-238; 1998.
27. Sanz, A.; Caro, P., Barja, G. Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. *J. Bioenerg. Biomembr.* **36**: 545-552 ; 2004.
28. Constantopoulos, G.; Barranger, J.A. Nonenzymatic decarboxylation of pyruvate. *Anal. Biochem.* **139**, 353-358; 1984
29. Liu, Y.; Fiskum, G.; Schubert, D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.* **80**: 780-787; 2002.
30. Gredilla, R.; Barja, G.; Lopez-Torres, M. Effect of short-term caloric restriction on H₂O₂ production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria and location of the free radical source. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**: 279-287; 2001.

31. Korshunov, S.S.; Skulachev, V.P.; Starkov, A.A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* **416**, 15-18; 1997.
32. McCarter, R.J.; Palmer, J. Energy metabolism and aging: a lifelong study of Fisher 344 rats. *Am. J. Physiol.* **263**: E448-E452; 1992.
33. Rolfe, D.F.; Brown, G.C. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol. Rev.* **77**:731-758; 1997.
34. Brand, M.D. ; Affourtit, C. ; Esteves, T.C. ; Green, K. ; Lambert, A.J. ; Miwa, S. ; Pakay, J.L. ; Parker, N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic. Biol. Med.* **37**:755-767; 2004.
35. Owen, M.R.; Doran, E.; Halestrap, A.P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J.* **348**: 607-614; 2000.
36. Casteilla, L.; Rigoulet, M.; Penicaud, L. Mitochondrial ROS metabolism: modulation by uncoupling proteins. *IUBMB Life* **52**:181-188; 2001.
37. Boss, O.; Hagen, T.; Lowell, B.B. Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes* **49**:143-156; 2000.
38. Wang, Z.; Pei, H.; Kaeck, M.; Lu, J. Mammary cancer promotion and MAPK activation associated with consumption of a corn oil-based high fat diet. *Nutr. Cancer* **34**: 140-146; 1999.
39. Slim, R.M.; Toborek, M.; Watkins, B.A.; Boissonneault, G.A.; Hennig, B. Susceptibility to hepatic oxidative stress in rabbits fed different animal and plant fats. *J. Am. Coll. Nutr.* **15**: 289-294; 1996.
40. Kritchevsky, D. Colorectal cancer: the role of dietary fat and caloric restriction. *Mutat. Res.* **290**, 63-70; 1993.
41. Talbot, D.A.; Lambert, A.J.; Brand, M.D. Production of endogenous matrix superoxide from mitochondrial complex I leads to activation of uncoupling protein 3 *FEBS Lett.* **556**:111-115; 2004.

42. Bernardi, P.; Colonna, R.; Costantini, P.; Eriksson, O.; Fontaine, E.; Ichas, F.; Massari, S.; Nicolli, A.; Petronilli, V.; Scorrano, L. The mitochondrial permeability transition. *BioFactors* **8**: 273-281; 1998.
43. Vercesi, A.E.; Kowaltowski, A.J.; Grijalba, M.T.; Meinicke, A.R.; Castilho, R.F. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci.Rep.* **17**, 43-52; 1997.

	Standard Chow (UAR A03) g/100g dry wt	High Fat Diet g/100g dry wt
Cornstarch	62	0
Casein	22.7	30
Vegetable oils	4.5	5
Lard	0	48
Mineral-Vitamins	6.25	7.0
Cellulose	4.5	10.0
Energy value [Kcal/100g]	379	597

Table 1 - Composition of the diets

Diets were supplied by Usine Alimentation Rationnelle (Epinay/Orge, France)

		Wistar	Lou/C-HC	Lou/C-HF
GLUT/MAL	<i>State 4</i>	17.3 ± 1.2	16.7 ± 1.6	16.5 ± 1.7
	<i>State 3</i>	333 ± 12	293 ± 13‡	386 ± 26
	<i>RCR</i>	20.2 ± 1.7	19.4 ± 1.8	24.2 ± 1.8
SUCCINATE	<i>State 4</i>	45.3 ± 1.3*	46.7 ± 2.7*	51.8 ± 3.3*
	<i>State 3</i>	321 ± 13	295 ± 12	302 ± 36
	<i>RCR</i>	7.1 ± 0.2*	6.4 ± 0.3*	5.8 ± 0.6*
GLUT/MAL+ SUCC	<i>State 4</i>	49.0 ± 1.8*	47.9 ± 1.8*	55.7 ± 4.5*
	<i>State 3</i>	410 ± 17*†	401 ± 21*†	447 ± 22†
	<i>RCR</i>	8.5 ± 0.4*†	8.4 ± 0.4*†	8.3 ± 0.7*†

Table 2: Oxygen consumption measurements in skeletal muscle mitochondria from Wistar and Lou/C rats fed either a high carbohydrate (HC) or a high fat (HF) diet. Mitochondria were isolated as described in Materials and methods. Respiratory rate was determined at 30°C with glutamate/malate and/or succinate. Values are means ± SEM for 10 animals. State 4 was the control state of respiration measured in the presence of oligomycin. State 3 was the ADP-stimulated respiration. RCR was the respiratory control ratio [(state3)/(state 4)].

*: significantly different from glutamate/malate in the same rat's group

†: significantly different from succinate in the same rat's group

‡: significantly different from Wistar

	Wistar	Lou/C-HC	Lou/C-HF
Complex I (nmole/min/mg protein)	243 ± 18	189 ± 9‡	235 ± 11#
Complex II (nmole/min/mg protein)	150 ± 13	120 ± 11‡	145 ± 27
Complex IV (nmole/min/mg protein)	1481 ± 98	1541 ± 89	1762 ± 130
Citrate synthase activity (nmole/min/mg protein)	1598 ± 88	1715 ± 107	2215 ± 116 ‡#

Table 3: Enzymatic activities of individual complexes of the electron transport chain and matrix enzyme (citrate synthase) in skeletal muscle mitochondria from Wistar and Lou/C rats fed either with a high carbohydrate (HC) or a high fat (HF) diet. Activities were expressed in nmoles of oxidized or reduced substrates by each complex. Values are means ± SEM for 10 animals

‡: significantly different from Wistar

#: significantly different from Lou/C-HC

Figure 1: Body growth and food intake of Wistar and Lou/C rats fed either a high carbohydrate (HC) or a high fat (HF) diet. Values are means $\pm$ SEM for 10 animals.

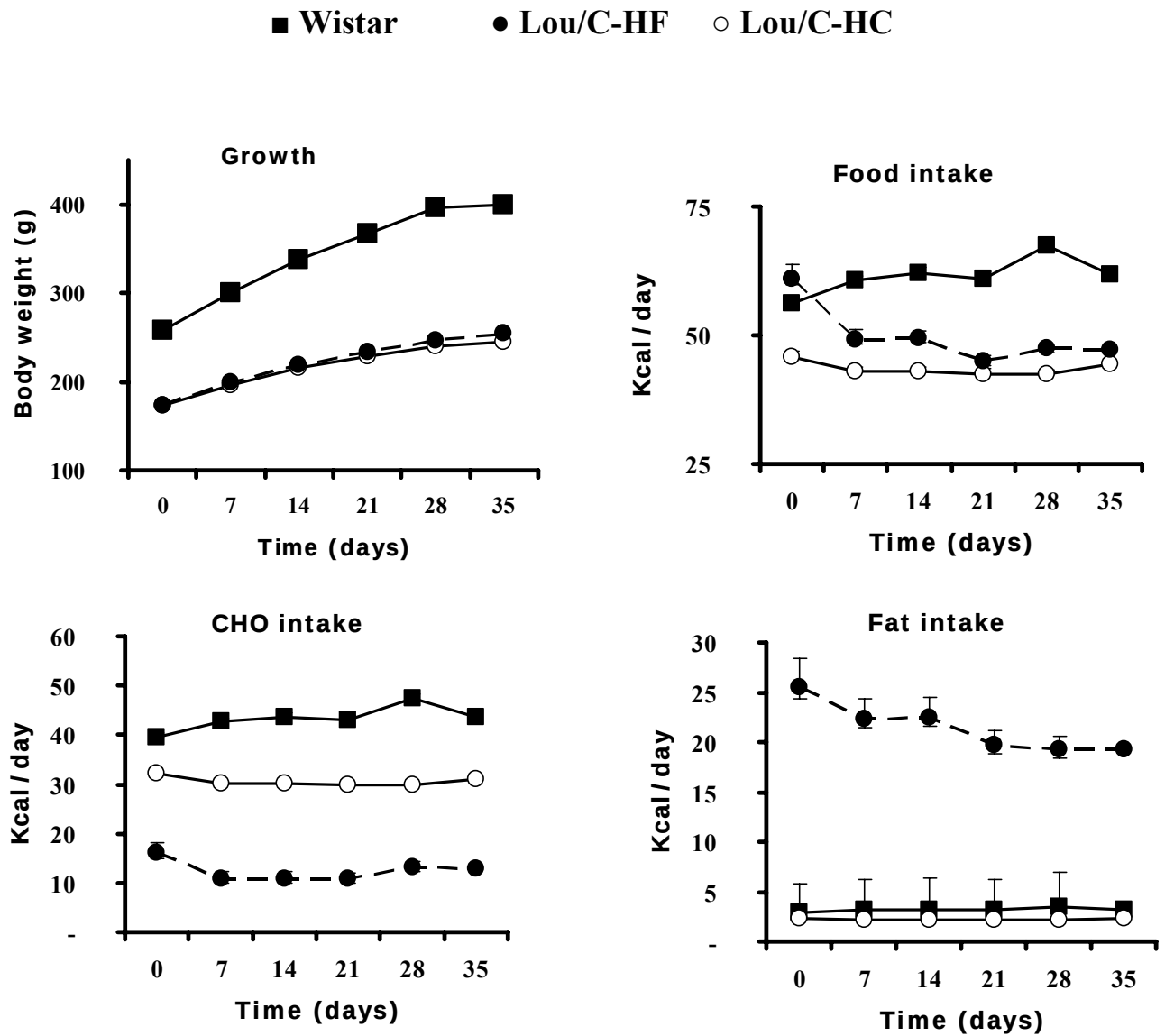
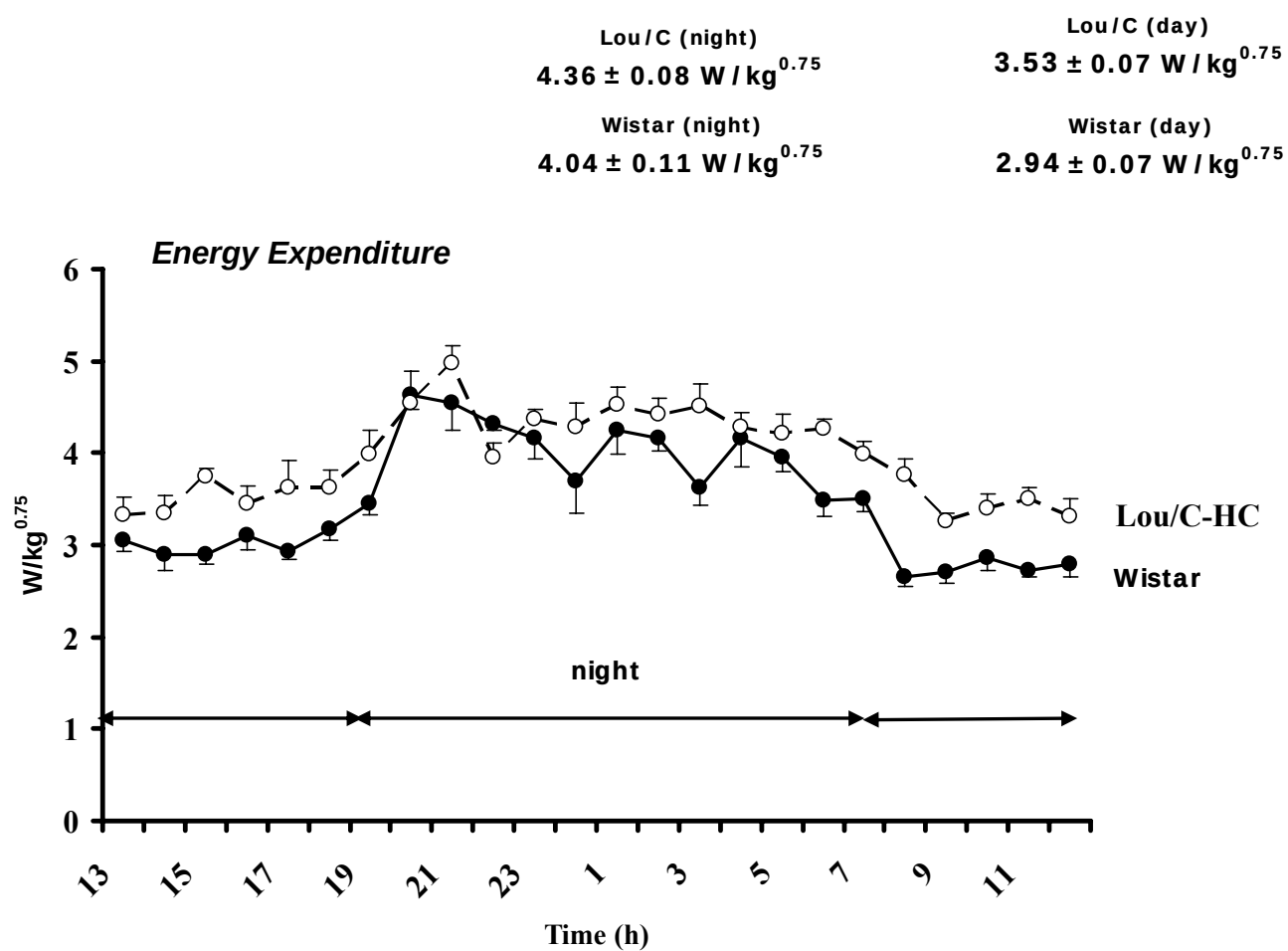


Figure 2: Total Energy Expenditure (measured by indirect calorimetry) and locomotor activity (actimeter) of Lou/C and Wistar rats. Values are means $\pm$ SEM for 5 animals. Energy expenditure is expressed as mass-adjusted O₂ consumption (i.e per kg^{0.75}). Locomotor activity is expressed as horizontal (right and left; back and forth) and vertical (rearing) movements of the animals during the circadian dark and the light period.



B

Locomotor activity

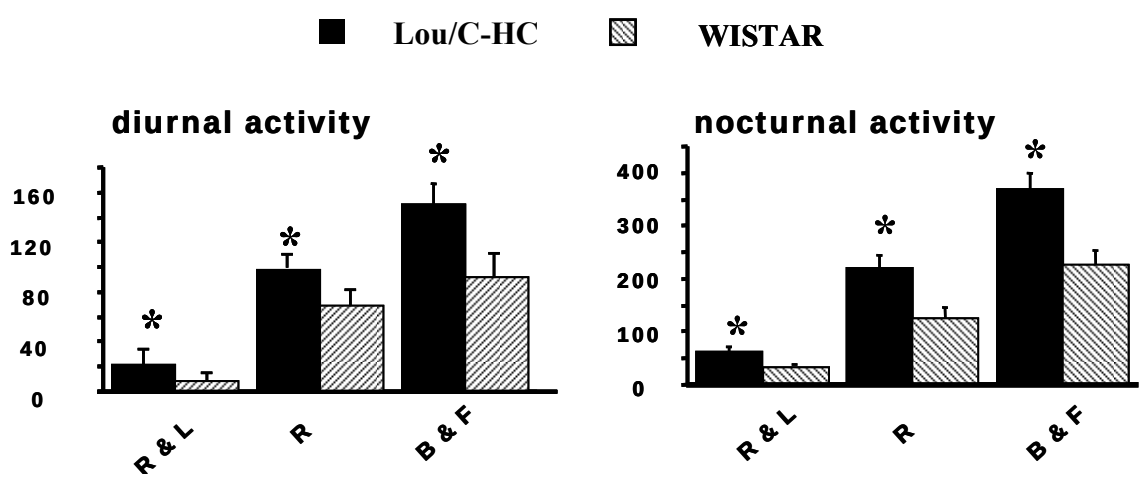


Figure 3: Mitochondrial H₂O₂ production by skeletal muscle mitochondria from Wistar and Lou/C rats fed either a high carbohydrate (HC) or a high fat (HF) diet. Values are means $\pm$ SEM for 10 animals. ND: not detectable

a: significantly different from substrate alone; b: significantly different from Lou/C-HC
c: significantly different from Wistar; d: significantly different from succinate

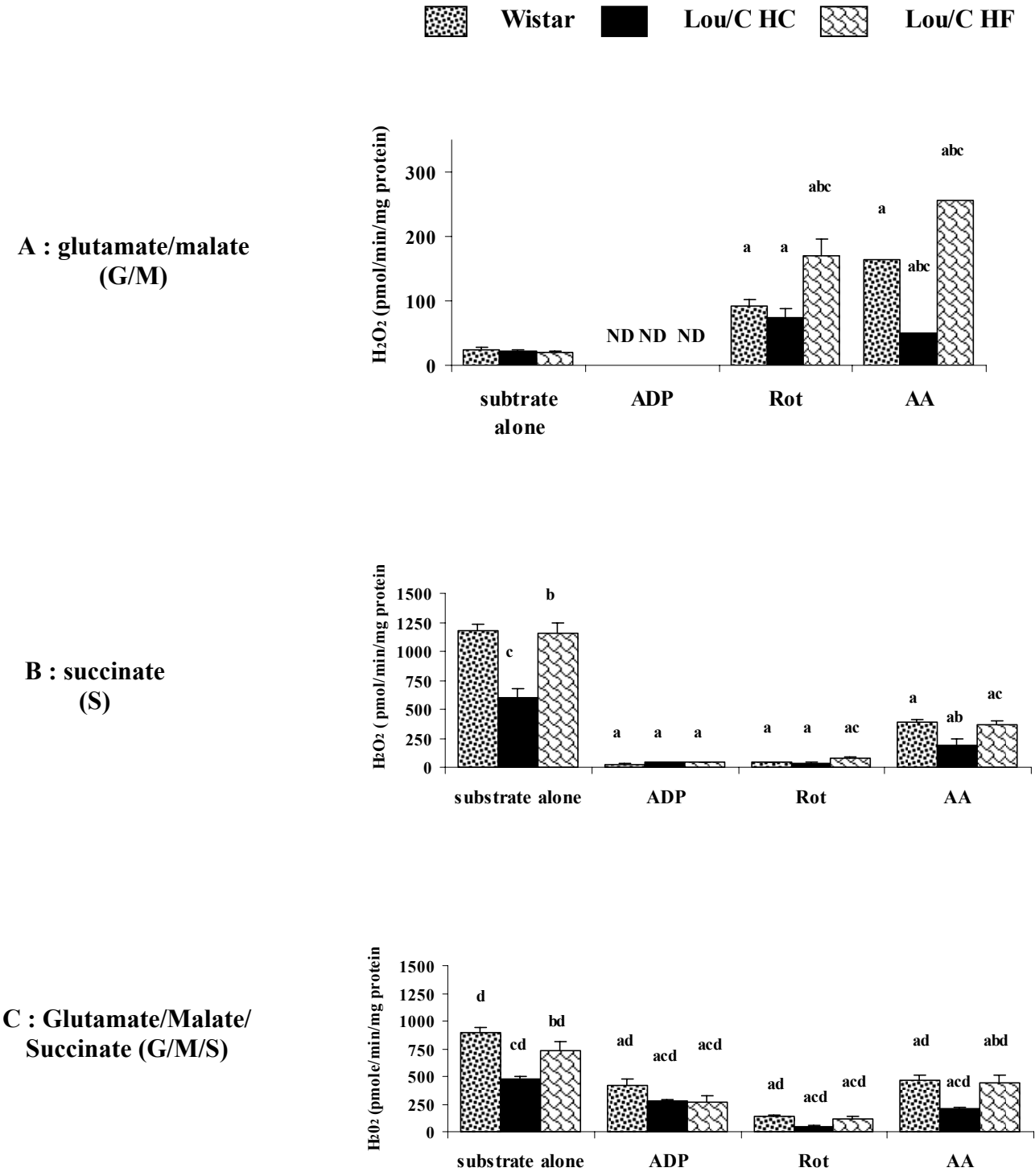


Figure 4. Effect of palmitate on mitochondrial proton conductance from Wistar (*closed symbols*) and Lou/C rats (*open symbols*). Mitochondria (0.35 mg/ml) were incubated at 30 °C in assay buffer containing 120 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 3 mM Hepes, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 0.3% (w/v) BSA, 150 M palmitate, 5 M rotenone, 1 g/ml oligomycin, and 65 ng/ml nigericin, pH 7.2. The kinetics of the mitochondrial proton leak were obtained by simultaneous measurement of membrane potential and oxygen consumption, using succinate as a substrate and varying the potential with sequential additions of malonate up to 3 mM. (A) Control conditions; (B) activation by addition of palmitate; (C) prevention of activation by GDP. All data are means $\pm$ SEM of n = 4-5 rats per group.

*: significantly different from Wistar at the same $\Delta\Psi$ (see insert in B)

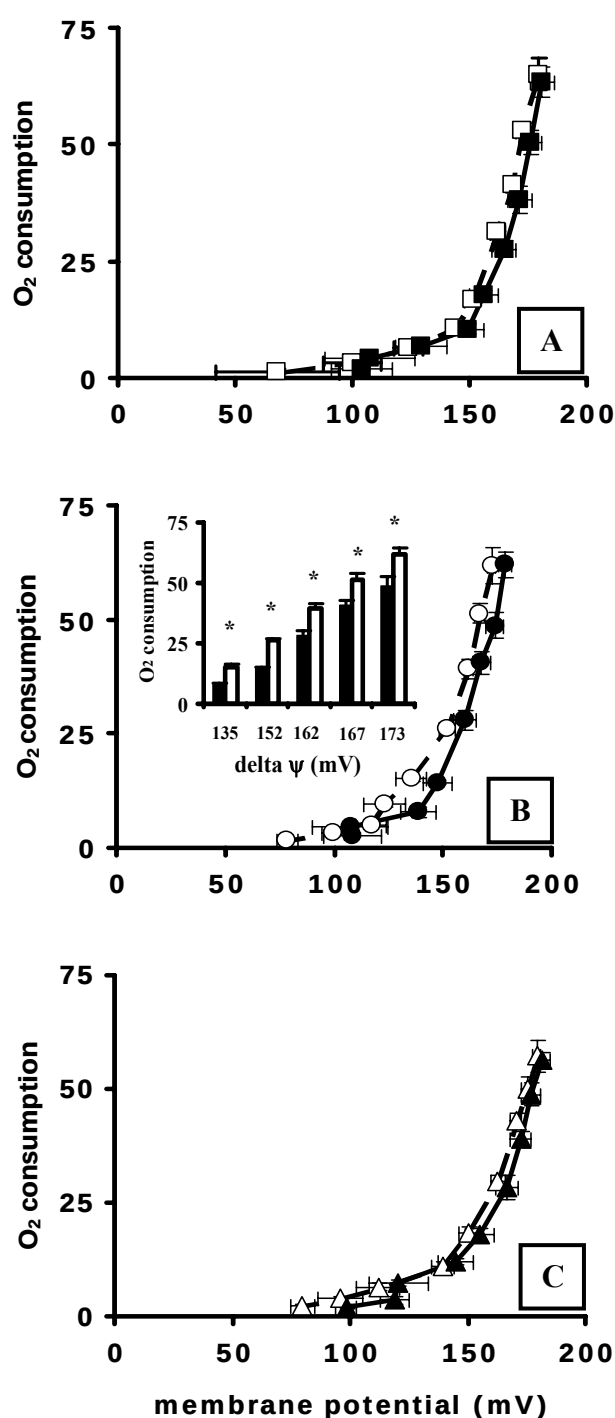


Figure 5. UCP2- and UCP3-mRNA expression relative to β -actin, as determined by RT-PCR in Wistar and Lou/C rats fed a high-carbohydrate (HC) or a high-fat (HF) diet. Data were quantified by integrating densitometry.

*: significantly different from Wistar

†: significantly different from Lou/C-HC

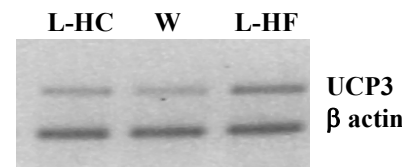
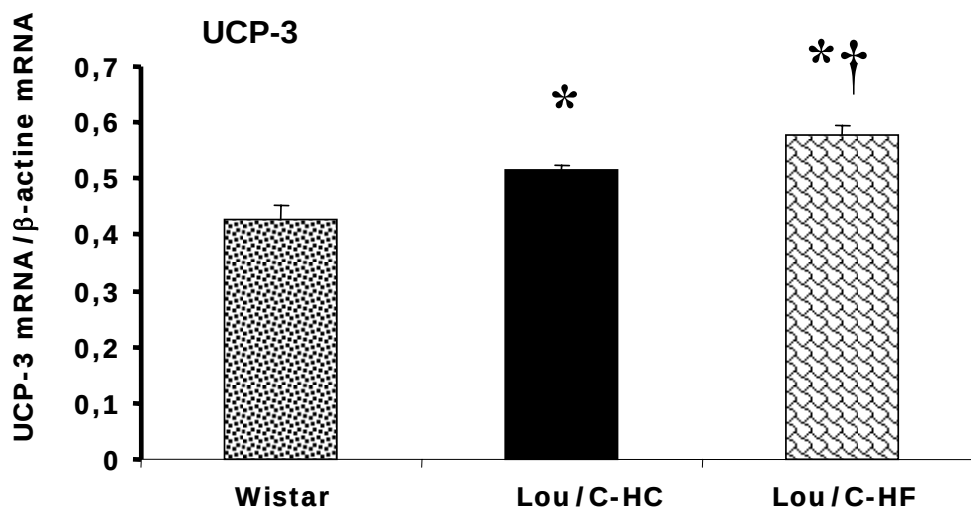
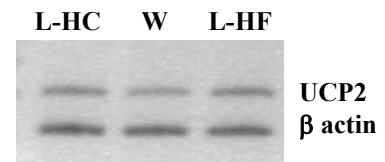
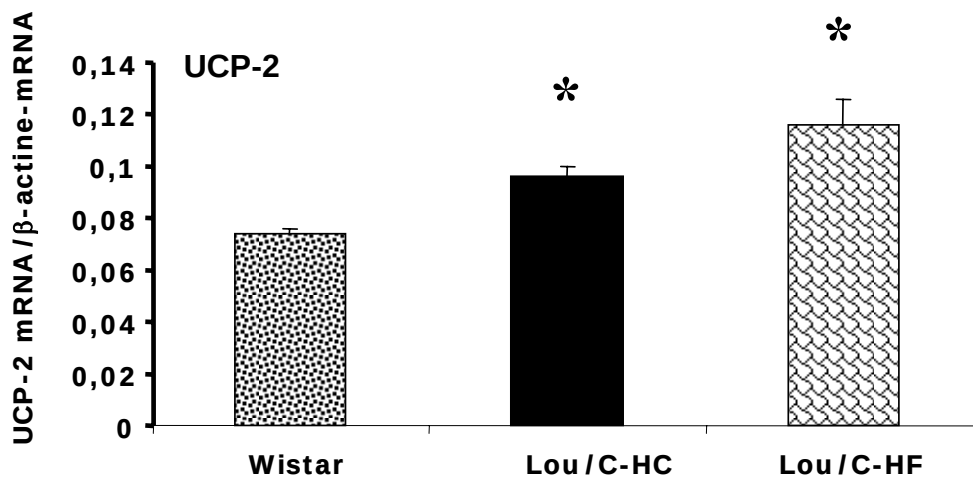
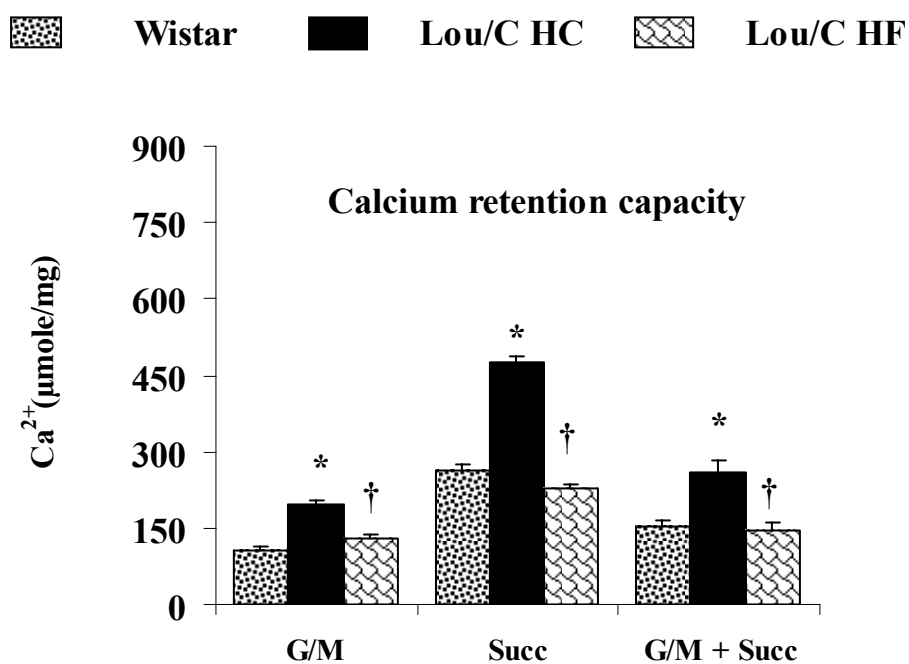


Figure 6: Calcium retention capacity by skeletal muscle mitochondria from Wistar and Lou/C rats fed either with a high carbohydrate (HC) or a high fat (HF) diet. Values are means $\pm$ SEM for 10 animals.

*: significantly different from Wistar

†: significantly different from Lou/C-HC



La principale source d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) est la mitochondrie, par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. Elle produirait en effet 90% des ROS cellulaires. Mais deux paramètres essentiels peuvent moduler cette production : la nature des équivalents réduits (NADH, H⁺ et FADH₂) utilisée par la chaîne respiratoire et l'apport en oxygène. Ainsi nous nous sommes intéressés aux effets des régimes alimentaires (modifiant la proportion entre NADH, H⁺ et FADH₂) et à l'hyperoxie (modifiant l'apport en oxygène) sur la production d'H₂O₂ par les mitochondries de muscle squelettique et/ou de foie de rats.

Nous avons ainsi mis en évidence que d'une part, chez le rat Lou/C, une souche caractérisée par une prise alimentaire spontanément réduite, la quantité d'H₂O₂ produite par les mitochondries de muscle squelettique est deux fois plus faible que celle des rats Wistar (souche dont il est issu). Ceci s'expliquerait par une diminution de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire. Cependant, lorsque la proportion en lipides ingérée est augmentée (high fat diet, HF), la production de ROS chez les Lou/C-HF devient comparable à celle des rats Wistar.

D'autre part, le régime riche en fructose entraîne une augmentation de la quantité d'H₂O₂ générée par les mitochondries de foie et de muscle squelettique de rats Wistar. Ceci pourrait être dû à une augmentation du flux inverse d'électrons à travers le complexe I, dans le foie et un déficit des défenses antioxydantes, dans le muscle. Toutefois, cette importante production de ROS peut être prévenue par le traitement à la GliSODin[®] (contenant de la SOD végétale).

Enfin, contre toute attente, le préconditionnement hyperoxique (4 jours à 50% d'O₂ suivi de 5 jours à 80% d'O₂), diminue la production de ROS dans les mitochondries de foie de rats Wistar. Celle-ci pourrait être liée à l'augmentation de l'activité de la cytochrome c oxydase observée chez ces rats.

Par ailleurs, les effets antioxydants de la GliSODin[®] semblent se mettre en place progressivement. Si l'activité de la cytochrome c oxydase est augmentée après 3 semaines de traitement, elle est restaurée après 5 semaines de traitement. Dès lors, les effets bénéfiques de la GliSODin[®] pourraient être la conséquence d'une stimulation d'enzymes antioxydantes.

Mitochondria, through its respiratory chain, is the main source of reactive oxygen species (ROS) and produces 90% of cellular ROS. Two essential parameters can however modulate that production: the nature of reduced equivalents (NADH, H⁺ and FADH₂) used by the respiratory chain, and the supply in oxygen. We studied at the effects of diets (modifying the proportion between NADH, H⁺ and FADH₂) and of hyperoxia (modifying the supply in oxygen) on the production of H₂O₂ by skeletal muscle and/or liver rat mitochondria.

We showed that the rate of H₂O₂ produced by skeletal muscle mitochondria is twice as small in Lou/C rats (strain characterized by spontaneous food intake reduction) as in Wistar rats (strain that it stems from). This can be explained by the reduction of complex I activity of the respiratory chain. In Lou/C-HF rats, when the proportion of ingested lipids is increased (high fat diet, HF), the production of ROS becomes similar to that of the Wistar rats.

High fructose diet leads to an increase of H₂O₂ released by Wistar rats skeletal muscle and liver mitochondria. This could result from the increase of electron reverse flux through the complex I in the liver, and from the lack of antioxidant systems in the skeletal muscle. Moreover the production of ROS can be prevented by GliSODin[®] administration (containing vegetable SOD).

Surprisingly, the hyperoxic preconditioning (4 days at 50% of O₂ followed by 5 days at 80% of O₂) reduces the production of ROS in Wistar rat liver mitochondria. This can be linked to an increase of cytochrome c oxidase activity in these rats.

The antioxidant effects of the GliSODin[®] appear to be time dependant: the cytochrome c oxidase activity is increased after a 3-week treatment and is re-established after a 5-week treatment. One can conclude then that the beneficial effects of the GliSODin[®] could result from antioxidant enzymes stimulation.

MOTS CLES : ROS, mitochondrie, chaîne respiratoire, rat Lou/C, régime riche en lipides, régime riche en fructose, hyperoxie, GliSODin[®]