



HAL
open science

La bioénergétique systémique moléculaire des cellules musculaires : Mécanismes de régulation de la respiration mitochondriale *in vivo* – importance des propriétés au niveau du système

Rita Cherpec

► To cite this version:

Rita Cherpec. La bioénergétique systémique moléculaire des cellules musculaires : Mécanismes de régulation de la respiration mitochondriale *in vivo* – importance des propriétés au niveau du système. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT : . tel-00397648

HAL Id: tel-00397648

<https://theses.hal.science/tel-00397648>

Submitted on 22 Jun 2009

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.

UNIVERSITÉ GRENOBLE I – JOSEPH FOURIER

Thèse présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

ECOLE DOCTORALE CHIMIE ET SCIENCE DU VIVANT

Spécialité : Physiologie, Physiopathologie et Pharmacologie

**La bioénergétique systémique moléculaire des cellules musculaires :
Mécanismes de régulation de la respiration mitochondriale *in vivo* –
importance des propriétés au niveau du système**

Rita CHERPEC

Thèse dirigée par le Pr. Valdur Saks et le Pr. Christophe Pison

Soutenu le vendredi 12 juin 2009

Devant le jury de thèse :

Pr. Xavier Lerverve, MD, PhD	Président
Pr. Frank Norbert Gellerich, PhD	Rapporteur
Pr. Pierre Dos Santos, MD, PhD	Rapporteur
Pr. Valdur Saks, PhD	Examineur
Pr. Francois Boucher, PhD	Examineur
Dr. Bernard Aguilaniu, MD, PhD	Examineur
Pr. Christophe Pison, MD, PhD	Invité

Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, INSERM U884, UJF, Grenoble I

Remerciements

Je remercie tout spécialement le professeur Valdur SAKS de m'avoir encadrée et de m'avoir accordé son plus grand soutien. Sa présence était essentielle à la réalisation de ma thèse. Le professeur SAKS est quelqu'un de très humain et généreux qui a su partager avec moi ses compétences scientifiques et m'a beaucoup apporté sur le plan pédagogique, humain et avant tout intellectuel. Je le remercie également de s'être toujours montré présent et accessible.

Je remercie de manière très chaleureuse le Pr. Christophe PISON, sans qui cette collaboration n'aurait jamais vu le jour. Dès mon arrivée en France, c'est dans son équipe médicale que j'ai pu tout d'abord réaliser un stage de recherche clinique qui fut le début d'une riche collaboration de 4 années me permettant aujourd'hui de présenter ce travail.

Je remercie le Pr. Xavier LEVERVE, directeur du Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée qui m'a donné cette grande opportunité de m'accueillir dans son laboratoire.

Ces remerciements s'adressent également au Dr. Bernard AGUILANIU pour la pertinence de ses réflexions permettant de concilier la recherche clinique et fondamentale.

Merci au Pr Pierre DOS SANTOS, au Pr Franc Norbert GELLERICH, au Pr Francois BOUCHER d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et dont les avis et commentaires me sont très précieux.

Je remercie vivement le Conseil Scientifique d'AGIR@dom et son Président le Pr. Ch. BRAMBILLA et le Président d'AGIR@dom, le Pr. B. PARAMELLE qui ont financé ce travail et permis ainsi sa réalisation.

Mes remerciements s'adressent également

à l'équipe du **Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, INSERM U884**

Dr. Nathalie BERAUD pour son suivi efficace et professionnel tout au long de cette thèse, à mes collègues du groupe Dr. Karen GUERRERO, Claire MONGE

Dr. Malgorzata TOKARSKA-SCHLATTNER, Dr. Valérie CHATTE, Pr. Eric FONTAINE, Pr. Uwe SCHLATTNER, Dr. Hervé DUBOUCHAUD, Dr. Christiane CHAUVIN, Dr. Cécile COTTE, Dr. Luc DEMAISON, Dr. Cecile BATENDIER, Dr. Karin COUTURIER, Dr. José OLIVARES, Dr. Cecile BATENDIER, Dr Karine COUTURIER, Joëlle DEMAISON, Cindy TELLIER, Gerard LARMURIER, Sarah HAMANT, Isabelle FAURE, Serge SOYEZ, Anna BRUKNER, Sacnicte RAMIRES, Séverine GRATIA, Guillaume VIAL, pour leur précieuse assistance professionnelle dans ce travail.pour leur soutien, aide et amitié.

à l'équipe du **National Institute of Chemical Physics and Biophysics, Tallinn, Estonia**

Dr. Tuuli KAAMBRE, Nathalja TIMOHHINA, Kersti TEPP, Dr.Peeter SIKK, Maire PEITEL, dont la riche collaboration a conduit à la publication de plusieurs articles.

Mes remerciements aux équipes du Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble

Laboratoire des Explorations Fonctionnelles Cardio Respiratoires :

Pr. Patrik LEVY, Pr. Jean Louis PEPIN, Dr. Renaud TAMISIER, Mireille GUYARD, Mireille ROULLIER, Julien BRIDGITE, où j'ai été accueillie très chaleureusement et qui m'ont fait partager leurs connaissances professionnelles et humaines en m'intégrant dans le projet clinique.

Centre des Investigations Cliniques

Dr. Jean Luc CRACOVSKI, Nicole HENQUIN, Dominique ABRY, pour leur investissement efficace dans la réalisation du protocole

Pôle de Médecine Aigue et Communautaire

Hubert ROTH, Elisabeth MACLET, Dr. Cecile CHERION, Dr. W.ANIWIDYANINGSIH pour leur aide et conseils précieux

Pôle de Rééducation et de Physiologie

Dr. Bernard WUYAM, Dr. Samuel VERGES, Nicolas DECORTE, pour l'apprentissage indispensable aux diverses techniques d'évaluation clinique nécessaires à la réalisation du protocole.

Pôle de Patologie cellulaire Dr. Paulette MEZIN ; Département de Biologie Integree

Dr. Catherine GARREL, pour toutes les analyses essentielles aux résultats de ce travail

CNRS, UMR 7091 LGN, Paris : Dr. Charles AUFFRAY, Dr. Eric EVENO pour leur investigation dans le domaine génétique et pour m'avoir accueillie dans leurs discussions scientifiques enrichissantes

Dr. Christelle KOEHLIN-RAMONOTXO pour la conception initiale du protocole clinique

Un grand merci à tous les patients BPCO et sujets volontaires qui ont accepté de participer à toutes ces recherches.

RESUME

L'objectif du travail est d'étudier les mécanismes de régulation in situ de la respiration mitochondriale des cellules musculaires afin de comprendre l'interdépendance entre la régulation de la respiration, les flux énergétiques et l'organisation structurale des cellules.

Pour cela, nous avons analysé la cinétique de la régulation de la respiration des cellules cardiaques perméabilisées en présence d'un système mimant les effets du système glycolytique in situ, et par microscopie confocale, l'organisation mitochondriale a été étudiée.

Les résultats montrent que les propriétés cinétiques de la MtCK in situ diffèrent significativement de celles des mitochondries isolées et que la régulation de la respiration in vivo est une propriété dépendant du niveau d'organisation du système, comprenant les interactions mitochondries-cytosquelette, les MgATPases cellulaires, le système d'enzymes glycolytiques du cytoplasme et les mécanismes de phosphotransfert via la navette PCr/CK, ceci afin de faire face aux restrictions hautement sélectives de la diffusion au niveau de la membrane externe mitochondriale in situ.

De plus, l'effet cardiotoxique de la doxorubicine sur les fibres cardiaques a été étudié, se traduisant par la perte du couplage fonctionnel de la MtCK avec l'oxydation phosphorylante.

Ce protocole a également été appliqué lors d'investigations cliniques sur des biopsies du muscle vaste latéral externe, chez les patients atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive. Le dysfonctionnement musculaire est caractérisé par une affinité élevée pour l'ADP libre de l'oxydation phosphorylante et par une affinité importante de la MtCK pour la créatine qui ne change pas après l'entraînement.

Mots clés : cardiomyocytes, bioénergétique, régulation de la respiration, créatine kinase, interactosome, bronchopneumopathie chronique obstructive

ABSTRACT

Molecular system bioenergetics of muscle cells: Mechanisms of regulation of respiration *in vivo* – importance of system level properties

The aim of our work is to study mechanisms of *in situ* regulation of respiration of permeabilized muscle cells in order to understand the relationship between regulation of oxidative phosphorylation, energy fluxes and structural organization of the cells.

We performed complete kinetic analysis of regulation of respiration *in situ* of permeabilized cardiac myocytes, supplemented with a system which modeling the effects of glycolysis. The mitochondria network structure was studied using confocal microscopy. Mechanisms of regulation of respiration and energy fluxes *in vivo* are system level properties. They depend on the complexity of cellular organization and intracellular interactions of mitochondria with cytoskeleton, intracellular MgATPases and cytoplasmic glycolytic system and mechanisms of phosphotransfer and feedback regulation via PCr/CK shuttle in the presence of highly selective restriction to the diffusion at the level of the outer mitochondrial membrane.

We applied this protocol to study the regulation of mitochondrial respiration in experimental and clinical studies. The investigation of cardiotoxic effect of doxorubicin showed that its mechanism is highly dependent on the loss of MtCK/OxPhos functional coupling.

Skeletal muscle dysfunction of patients with chronic obstructive pulmonary disease is characterized by a high affinity of oxidative phosphorylation for free ADP which decreases after endurance training and high affinity of MtCK for creatine which does not change significantly after training.

Keywords: cardiomyocytes, bioenergetics, regulation of respiration, créatine kinase, interactosome, chronic obstructive pulmonary disease

TABLE DES MATIERES

LISTE DES PUBLICATIONS FAISANT L'OBJET DE CE MEMOIRE	10
AUTRES PUBLICATIONS	11
INTRODUCTION.....	12
I. LA BIOLOGIE DES SYSTEMES	13
1. La bioénergétique moléculaire systémique. Notes historiques	14
2. La thermodynamique chimique et le système vivant	16
3. L'extraction de l'énergie libre de Gibbs par les cellules musculaires : la synthèse de l'ATP.....	20
3.1 La glycolyse	21
3.2. La phosphorylation oxydative.....	21
3.2.1. La membrane interne mitochondriale.....	22
a. La chaîne des transporteurs d'électrons.....	23
b. L'ATP synthase	26
c. L'ANT, le carrier de transport des nucléotides adényliques.....	28
d. L'ATP synthasome.....	30
3.2.2. La membrane mitochondriale externe	31
II. LE METABOLISME ENERGETIQUE INTEGRE DANS LES CELLULES MUSCULAIRES : LIEU DE TRANSFORMATION DE L'ENERGIE CHIMIQUE LIEE AU POTENTIEL DE PHOSPHORYLATION EN UN TRAVAIL MECANIQUE.....	32
1. La contraction musculaire	32
1.1. Le module contractile	32
1.2. Le couplage Excitation-Contraction.....	35
1.3. La loi de Frank-Starling.....	36
2. Le métabolisme énergétique intégré. Le réseau intracellulaire de transfert de groupes phosphoryles	38
2.1. La diffusion et la compartimentation de l'ATP.....	38
2.1.1. La créatine kinase mitochondriale (MtCK).....	39
2.1.2. Le couplage fonctionnel de la MMCK avec la myosine ATPases	41
2.2. Les réseaux du transfert du groupe phosphate (les navettes CK/PCr et l'AK).....	42
2.2.1. La navette CK/PCr	42
2.2.2. La navette adénylate kinase	44
3. Le module énergétique	46
III. LA REGULATION DE LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE DANS LES CELLULES MUSCULAIRES	48
1. Les théories de la régulation de la respiration mitochondriale	48
1.1. Le phénomène d'homéostasie (stabilité) métabolique.....	48
1.2. La théorie de l'équilibre de la réaction CK	49
1.3. L'hypothèse de l'activation parallèle de l'hydrolyse de l'ATP et de la phosphorylation oxydative par le Ca ²⁺	49
1.4. La théorie du transfert de l'énergie compartimentée.....	50
2. Le rôle de la membrane externe mitochondriale comme barrière de diffusion sélective dans la régulation de la respiration - le rôle du cytosquelette	52
3. La régulation du métabolisme énergétique dans les cardiomyocytes	54
4. Aspects spécifiques du métabolisme énergétique du muscle squelettique	58
PROBLEMATIQUE.....	60
MATERIEL ET METHODES.....	62
I. PREPARATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE.....	63
1. Animaux	63
2. Préparation des fibres musculaires de rat.....	63
3. L'isolement des cardiomyocyte adultes de rat.....	63
4. Isolement des mitochondries de cœur de rat.....	64
5. Culture des cellules HL-1.....	64

II. METHODES	65
1. La procédure de perméabilisation des cardiomyocytes ou des fibres musculaires	65
2. La procédure de digestion protéolytique par la trypsine	65
3. Oxygraphie	66
3.1. Principe.....	66
3.2. Les modèles expérimentaux	66
3.3. Tests oxygraphiques.....	68
3.3.1. Test de contrôle de la respiration mitochondriale par l'accepteur d'ADP et de l'intégrité des membranes mitochondriales	68
3.3.2. Le contrôle de la respiration par l'ADP	69
3.3.3. Le contrôle de la respiration par l'ADP en présence de la créatine	69
3.3.4. Le contrôle de la respiration par la créatine en présence du système piège pour l'ADP (PEP-PK)...	70
3.3.5. L'analyse cinétique de la réaction catalysée par la créatine kinase.	70
3.3.6. Traitement des fibres cardiaques avec la doxorubicine	75
4. Spectrophotométrie	75
4.1. Principe.....	75
4.2. L'appréciation de la concentration en cytochrome aa ₃	76
5. Chromatographie en phase liquide de haute performance et de ultra-performance avec des paires d'ions (HPLC/UPLC – High Performance liquid chromatography	77
6. La détermination de la concentration des protéines	78
7. La microscopie confocale	78
8. Etude clinique : biopsie musculaire	78
RESULTATS	81
1^{ERE} ETUDE EXPERIMENTALE:	82
ETUDE COMPARATIVE DES DIFFERENTE CINETIQUES DE REGULATION DE LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE DANS LES CARDIOMYOCYTES PERMEABILISES ET LES CELLULES CARDIAQUES HL-1 NB : IMPORTANCE DE L'ORGANISATION STRUCTURALE DANS LA REGULATION DE LA RESPIRATION CELLULAIRE (article 4)...	82
2^{ERE} ETUDE EXPERIMENTALE:	86
ETUDE DE LA REGULATION DE LA RESPIRATION <i>IN SITU</i> CONTROLEE PAR LA MtCK ET DE LA MESURE DIRECTE DES FLUX ENERGETIQUES DES MITOCHONDRIES VERS LE CYTOPLASME DANS LES CELLULES CARDIAQUES PERMEABILISEES : importances des propriétés au niveau du système et quelques évidences en faveur de l'interactosome mitochondrial (articles 5 et 6).....	86
3^{EME} ETUDE EXPERIMENTALE:	101
EFFET DE LA DOXORUBICINE SUR LA REGULATION DE LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE DANS LES FIBRES CARDIAQUES PERMEABILISEES (article 7).	101
4^{EME} ETUDE EXPERIMENTALE:	103
LA BIOENERGETIQUE DE LA DYSFONCTION MUSCULAIRE ET LES EFFETS DE L'ENTRAINEMENT EN ENDURANCE DES MALADES ATTEINTS DE BRONCHOPNEUMOPATHIE OCHRONIQUE OBSTRUCTIVE (article 8).	103
DISCUSSION	109
BIBLIOGRAPHIE	126
PUBLICATIONS	145

LISTE DES ABREVIATIONS

ADP : Adénosine DiPhosphate
AMP : Adénosine MonoPhosphate
ANT : Adénine Nucléotide Translocase
AK : Adénylate Kinase
ATP : Adénosine TriPhosphate
ATR : Atractyloside
Ca²⁺ : Calcium
CICR : Calcium Induce Calcium Release
CK : Créatine Kinase
Cr : Créatine
DHPR : Récepteurs à la DiHydroPyridine
FAD : Flavine MonoNucléotide
ICEU : IntraCellular Energetic Unit
kDa : KiloDalton
LDH : Lactate DesHydrogénase
NADH : Nicotinamine Adénine Dinucléotide
PCr : PhosphoCréatine
PEP : PhosphoEnolPyruvate
PK : Pyruvate Kinase
PTP : Pore de Transition de Perméabilité
SERCA : Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase
RS : Réticulum Sarcoplasmique
VDAC : Voltage Dépendant Anion Channel

LISTE DES PUBLICATIONS FAISANT L'OBJET DE CE MEMOIRE

1. Saks V, Monge C, Guzun R. Philosophical Basis and Some Historical Aspects of Systems Biology: From Hegel to Noble - Applications for Bioenergetic. Research. *Int. J. Mol. Sci.* 2009, *10*, 1161-1192. Review
2. Saks V, Favier R, Guzun R, Schlattner U and Wallimann T.: Molecular system bioenergetics: regulation of substrate supply in response to heart energy demands. *Journal of Physiology. J Physiol.* 2006 Dec 15;577(Pt 3):769-77
3. Saks V, Dzeja PP, Guzun R, Aliev MK, Vendelin M, Terzic A, Walliman T.: System analysis of cardiac energetics-excitation-contraction coupling: integration of mitochondrial respiration, phosphotransfer pathways, metabolic pacing, and substrate supply in the heart. p.367-407, "Molecular System Bioenergetics" 2007 WILEY-VCH Verlag GmbH&KGaA, Weinheim, 604p. edited by Valdur Saks.
4. Anmann T, Guzun R, Beraud N, Pelloux S, Kuznetsov A, Ojeda C, Tourneur Y and Saks V.: Different kinetics of the regulation of respiration in permeabilised rat cardiomyocytes and in non-contracting HL-1 cardiac cells: importance of cell structure /organisation. *BBA Molecular Cell Research. Biochim Biophys Acta.* 2006 Dec; 1757(12):1597-606.
5. Guzun R, Timohhina N, Tepp K, Monge C, Kaambre T, Sikk P, Kuznetsov AV, Pison C, Saks V. Regulation of respiration controlled by mitochondrial creatine kinase in permeabilized cardiac cells in situ importance of system level properties. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Apr 8. [Epub ahead of print]
6. Timohhina N, Guzun R, Tepp K, Monge C, Varikmaa M, Vija H, Sikk P, Kaambre1 T, Sackett D. and Saks V. Directed measurements of energy fluxes from mitochondria into cytoplasm in permeabilized cardiac cells in situ: some evidence for mitochondrial interactosome. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* Submitted 2009
7. Tokarska-Schlattner M, Lucchinetti E, Zaugg M, Kay L, Gratia S, Guzun R, Saks V, Schlattner U. Early effect of doxorubicine in perfused heart: transcriptional profiling reveals inhibition of cellular stress responses. *Journal of Molecular Cellular Cardiology.* Submission 2009
8. Guzun R, Wuyam B, Aguilaniu B, Mezin P, Garrel C, Cracowski JL, Fontaine E, Hininger-Favier I, Roussel AM, Auffray C, Saks V, Pison C. La bioenergetique de la dysfonction musculaire et les effets de l'entrainement en endurance des malades atteints de bronchopneumopathie ochronique obstructive. Redaction.

AUTRES PUBLICATIONS

Saks V, Kaambre T, Guzun R, Anmann T, Sikk P, Schlattner U, Wallimann T, Aliev M, Vendelin M. The creatine kinase phosphotransfer network: thermodynamic and kinetic considerations, the impact of the mitochondrial outer membrane and modelling approaches. *Subcell Biochem.* 2007;46:27-65. Review.

Seppet EK, Eimre M, Anmann T, Seppet E, Piirsoo A, Peet N, Paju K, Guzun R, Beraud N, Pelloux S, Tourneur Y, Kuznetsov AV, Käämbre T, Sikk P, Saks VA. Structure-function relationships in the regulation of energy transfer between mitochondria and ATPases in ardiac cells. *Exp Clin Cardiol.* 2006 Fall;11(3):189-94.

Saks V, Aliev M, Guzun R, Beraud N, Monge C, Anmann T, Kuznetsov A and Seppet E. Biophysics of the organized metabolic networks in muscle and brain cells. *Transworld Research Networks.* Kerala, India. Recent research developments in byophysics. 2006. ISBN :81-7895 ;21

Guzun R, Pison C. Interactions gènes environnement au cours de la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive et l'Asthme. Relations avec la composition corporelle. *Nutrition Clinique et Métabolisme.* 2006;185-189

INTRODUCTION

I. La biologie des systèmes

La biologie des systèmes est l'étude des systèmes intégrés à tous les niveaux : cellule, organe, organisme et population et qui considère l'entier physiologique plutôt que la somme des parties qui le composent. Westerhoff a défini le but de la biologie des systèmes comme étant « de comprendre comment les fonctions biologiques, absentes chez les macromolécules isolées, apparaissent quand elles sont considérées comme des parties intégrées à ces systèmes » (Saks et al. 2009). Ces propriétés qui surviennent en résultat de l'interaction des composants du système ont été appelées les propriétés dépendantes du niveau d'organisation du système « System level properties ». Le métabolisme cellulaire intégré n'est pas une somme simple de réactions se déroulant dans un milieu homogène : mais semble d'être beaucoup plus que cela. En effet, des interactions spécifiques mènent à de nouveaux types de mécanismes de régulation, tels que l'acheminement et la compartimentation métabolique (Morel et Fleck 1989, Saks et al. 2007e). La propriété principale du système vivant comme étant un système thermodynamique ouvert est le métabolisme grâce auquel ce système échange de la matière et de l'énergie avec son environnement. L'évolution du système (du simple au complexe) implique le perfectionnement des réseaux métaboliques hautement spécialisés avec le respect du principe de la diversification, du contrôle (régulation) et de l'efficacité (Morel et Fleck 1989). La diversification des réseaux métaboliques permet d'exploiter les ressources de l'environnement. En conformité avec la théorie de Schrödinger, l'extraction de l'énergie libre du milieu externe sert à diminuer l'entropie (désordre) interne pour préserver ou améliorer le niveau d'organisation interne ayant pour but d'assurer une meilleure adaptation, une meilleure autonomie relative et finalement la survie du système vivant dans un environnement variable. (Schrödinger 1944).

L'autonomie relative d'un système vivant multicellulaire est possible grâce à la stabilité de son milieu interne ou à l'homéostasie. Historiquement, l'introduction de ce nouveau concept revient au brillant scientifique et médecin français Claude Bernard (Bernard 1984). Le concept de « constance du milieu intérieur » a révolutionné la pensée scientifique de nos jours en créant la biologie des systèmes. Un siècle plus tard, Norbert Wiener, le fondateur de la Cybernétique ou de la Science de l'information, a proposé l'explication des mécanismes de l'homéostasie - le principe de rétrocontrôle. Dans son livre, il a écrit que « la quantité d'information dans un système est une mesure de son degré d'organisation, et que l'entropie d'un système est une mesure de son degré de désorganisation » (Wiener 1965). Les aspects historiques et philosophiques sont décrits dans notre revue (article 1).

1. La bioénergétique moléculaire systémique. Notes historiques

Dans cette partie, nous allons faire un court rétrospectif historique et évoquer les principaux principes de la bioénergétique moderne afin de mettre en évidence des relations entre les notions de système thermodynamique, d'énergie, de travail, d'entropie et d'informations.

Bioénergétique. Notes historiques

- **Découverte de l'oxygène** par: A. L. Lavoisier (1775) ; J. Priestly (1774) ; C. Scheele (1773)
- **Création de la thermochimie** par Wilke (1781) avec l'étude de la « *Capacité des corps à produire la chaleur* » et par la calorimétrie à glace de Lavoisier et Laplace (1783) avec la *mesure de la chaleur spécifique*. « La respiration n'est qu'une combustion lente de carbone et d'hydrogène » faisant intervenir l'oxygène (Lavoisier)
- **La découverte de la glycolyse :**
 - *Levure* : A.Harden et W.Young (1906) ont montré la nécessité du phosphate et de la « cozymase » (NAD) pour la fermentation du glucose. Ensuite a été découverte la phosphorylation de tous les intermédiaires sauf des produits finaux : pyruvate, lactate et éthanol de la glycolyse.
 - *Muscle* : G.Embden et O.Meyerhof (années 1920) ont montré la transformation du glucose en acide lactique dans le muscle et ont extrait les enzymes glycolytiques du broyat de muscle
- **Découverte de l'ATP et de la PCr**
 - Subbarrow, P. Eggleton et G.P.Eggleton (1927) ont trouvé du phosphagène (PCr) dans le muscle de grenouille au repos qui disparaît avec la fatigue avec l'appariation du Pi et de la créatine.
 - Lohmann (1929) et Subbarrow (1930) ont extrait l'ATP « groupement pirophosphate » ou « l'adénine et le ribose phosphate » du muscle.
- **Relation entre le métabolisme énergétique, la contraction musculaire et la chaleur.**
 - A.V.Hill et O.Meyerhof (1922, Prix Nobel) ont découvert que l'énergie pour l'activité musculaire provient de la glycolyse qui, en absence de l'oxygène, donne l'acide lactique. L'oxygène est nécessaire que dans la phase de repos pour le resynthèse du glycogène.
 - E.Lunsgaard (1930) a montré la capacité du muscle à se contracter en présence de iodoacétate (inhibiteur de glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) sans production du lactate.
 - Clark (1932) a montré que la contraction du cœur isolé de grenouille tout d'abord est soutenue par l'oxydation des lipides ($CO_2/O_2=0,73-0,87$). Lohman (1936) a fait une observation semblable sur les muscles squelettiques des animaux à jeûn.
 - E.Lunsgaard (1930) a montré que la tension musculaire est proportionnelle au continu en *phosphorylcréatine* (PCr).
 - V.Engelhardt (1930) a découvert la phosphorylation oxydative : la consommation de l'O₂ est liée à la synthèse de l'ATP.
 - Lohman (1934) a décrit la réaction catalysée par la créatine kinase qui explique la relation entre la PCr et l'ATP.
 - Belitzer et Tsybakova (1939) ont découvert que la créatine rajoutée à l'homogénat du muscle squelettique stimule la respiration et induit la production du phosphagène. L'efficacité de la synthèse aérobie du phosphagène (P/O) est environ 6.
 - V.Engelhardt et M.Liubimova (1939) ont découvert l'activité ATPasique de la tête de myosine ; et ont relié la libération de l'énergie libre de l'hydrolyse de l'ATP au travail mécanique du muscle.
- **La découverte du rôle de la mitochondrie dans la respiration et la synthèse de l'ATP.**
 - Kennedy et Lehninger (1948-1950) ont intégré structurellement et fonctionnement le cycle de Krebs (découvert en 1937), la bêta-oxydation et la phosphorylation oxydative à la mitochondrie.
 - Peter Mitchel (1978) obtient le Prix Nobel pour la théorie chimiosmotique
 - P. Boyer et J. Walker ont reçu le *prix Nobel* de chimie (1997) pour leurs travaux sur le fonctionnement de l'ATP synthase

2. La thermodynamique chimique et le système vivant

La thermodynamique chimique traite des relations entre le travail, la chaleur et les transformations chimiques. Elle aide à étudier les caractéristiques des réactions chimiques de l'organisme vivant en physiologie et en pathologie. Un court énoncé des lois de la thermodynamique sur lesquelles est basée notre réflexion est donnée dans l'encadré qui suit.

Les principes de la thermodynamique classique

0 : *principe de l'équilibre thermique* : si deux systèmes thermodynamiques sont en équilibre thermodynamique avec un troisième, ils sont eux-mêmes en équilibre thermodynamique.

I : principe de *la conservation de l'énergie* : au cours d'une transformation quelconque d'un système fermé, la variation de son énergie totale est égale à la quantité d'énergie échangée avec le milieu extérieur sous forme de chaleur (énergie interne) et sous forme de travail.

$$dE = dq + dw$$

L'énergie de l'univers est constante (elle ne peut être ni créée ni détruite) à condition que la masse ne change pas.

II : le principe d'*entropie* : dans un système isolé il y a augmentation de l'entropie ou du désordre. La mesure de la quantité d'entropie : cal·°K⁻¹

$$\Delta S = \int_1^2 \frac{dQ}{T}$$

$$\Delta S \geq 0$$

Mesure statistique: l'entropie est égale au logarithme du nombre des micro-états du macro-système (W - dégénérescence selon Boltzmann, le nombre de façons différentes de répartir une même quantité d'énergie dans un état donné du système)

$$S = k_B \log W$$

III : l'*entropie* d'un système parfaitement ordonné à la température zéro K (-273°C) se rapproche de zéro

$$\lim_{T \rightarrow 0K} S = 0$$

En conformité avec le deuxième principe de la thermodynamique tous les processus chimiques survenant spontanément dans un système isolé (sans échange de matière ni d'énergie) évoluent vers l'augmentation de l'entropie jusqu'à l'équilibre. Dans un système fermé (avec l'échange de l'énergie) l'entropie est aussi la force motrice à condition que les modifications globales de l'entropie (du système et de son environnement) soient prises en compte. Ainsi « L'organisme vivant évite le déclin rapide vers l'état inerte d'équilibre en soutirant continuellement l'entropie négative de son milieu environnant » (Schrödinger 1944).

A partir de l'équation de Boltzman, Schrödinger a déduit *la mesure statistique de la négentropie* : si W – est une mesure du désordre (équation donnée dans l'encadré) sa réciproque $1/W$ – est une mesure d'ordre. Comme $\log(1/W) = -\log W$, l'équation de la négentropie devient :

$$S = k_B \log \frac{1}{W} \quad (1)$$

La cellule vivante diminue l'entropie interne en augmentant le degré d'organisation structurale et fonctionnelle et en augmentant l'entropie du milieu extérieure, ceci est possible grâce à l'ajustement des processus cataboliques avec des processus anaboliques et le travail, reliés entre eux par le cycle énergétique (Figure 1). Le métabolisme (catabolisme / anabolisme) est la voie par laquelle la négentropie ou l'énergie libre est extraite du milieu. « La finalité essentielle du métabolisme est de permettre à l'organisme de se libérer de toute l'entropie qu'il ne peut s'empêcher de produire tant qu'il est vivant » (Schrödinger 1944).

La notion de base de la thermodynamique qui relie les variations de l'énergie (E , Joule), l'entropie (S , cal·K⁻¹), le volume (V , m³) et le nombre de particules (n , mole) à la température (T , Kelvin), la pression (P , Pa) et le potentiel chimique (μ , enthalpie libre molaire partielle, cal·J⁻¹·mole⁻¹) est l'énergie libre de Gibbs représentant le potentielle

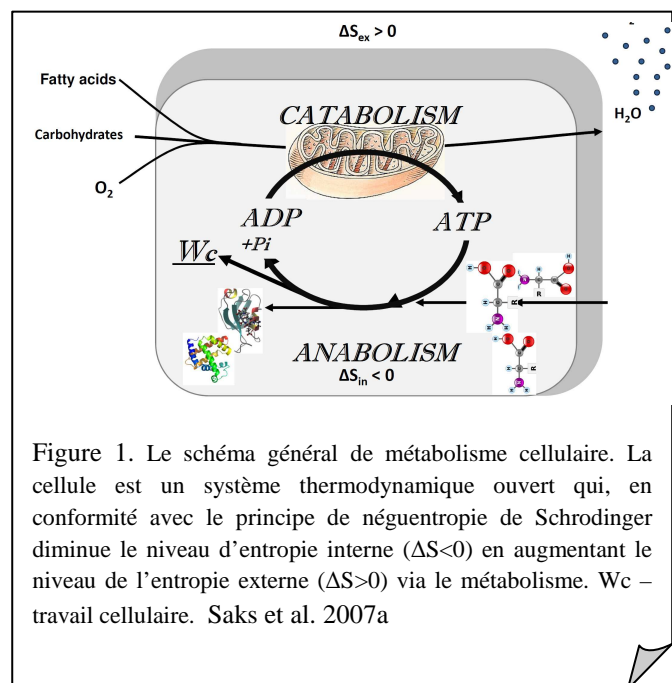


Figure 1. Le schéma général de métabolisme cellulaire. La cellule est un système thermodynamique ouvert qui, en conformité avec le principe de négentropie de Schrodinger diminue le niveau d'entropie interne ($\Delta S < 0$) en augmentant le niveau de l'entropie externe ($\Delta S > 0$) via le métabolisme. W_c – travail cellulaire. Saks et al. 2007a

thermodynamique d'un système et est exprimé en dépendance de mêmes paramètres thermodynamiques par l'équation :

$$G = E - TS + PV \quad (2)$$

$$E + PV = H \quad (3)$$

$$G = H - TS \quad (4)$$

où H - est l'enthalpie, qui est la quantité maximale de chaleur échangeable que le système peut produire.

La variation de l'énergie libre de Gibbs (ΔG) est une valeur qui représente la mesure quantitative de la somme de toutes les forces motrices existantes dans un système et reflète la capacité du système d'effectuer un travail utile :

$$dG = -SdT + VdP + \mu dn \quad (5)$$

μ étant le potentiel chimique du composé i , p la pression et T la température.

Dans des conditions d'absence des variations de température et de pression (système isobare et isotherme), dG dépend uniquement de la concentration molaire des composantes i (n_i) et de leurs potentiels chimiques, μ_i (G partiel par mole). Le potentiel chimique dépend de la concentration (C_i) de la substance dissoute :

$$\mu = \mu_i^0 + RT \ln \frac{C_i}{C^0} \quad (6)$$

(C_i – est la concentration molaire du composé i et μ_i^0 est le potentiel chimique standard correspondant à l'état de référence du système dans lequel la concentration $C^0=1$ M, $T = 298^\circ\text{K}$, $P = 1$ atm).

Pour les molécules portant des charges électriques (Z) (anion ou cation), en présence du potentiel électrique Ψ , μ devient une fonction de la concentration C du composé n appelée potentiel électrochimique, $\tilde{\mu}$:

$$\tilde{\mu} = \tilde{\mu}_i^0 + RT \ln \frac{C}{C^0} + ZF\Psi \quad (7)$$

(F – est la constante de Faraday, $96,480 \text{ J}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{V}^{-1}$).

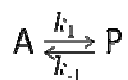
Pour la température (T) constante et pression (p) constante

$$dG = \sum_{i=1} \mu_i dn_i \quad (8)$$

et

$$G = \sum_i \mu_i n_i \quad (9)$$

Pour la réaction chimique ou biochimique



l'application de l'équation (éq.9) donne ΔG comme fonction du rapport d'action de mass (Γ) :

$\Gamma = [P]/[A]$ (Saks et al. 2007a)

$$\Delta G = 2.3RT \lg \frac{\Gamma}{K} \quad (10)$$

où 2.3 est le coefficient de calcul des logarithmes naturels en décimale, R – la constante du gaz parfait, T – la température absolue en Kelvin.

L'énergie libre de Gibbs représentée graphiquement en fonction du rapport d'action de masse des composantes de la réaction chimique (Γ) montre qu'une réaction irréversible peut se dérouler spontanément si l'énergie libre (G) diminue dans la direction de l'état d'équilibre ($\Gamma/K=1$, (K —constante d'équilibre)). (Figure 2)

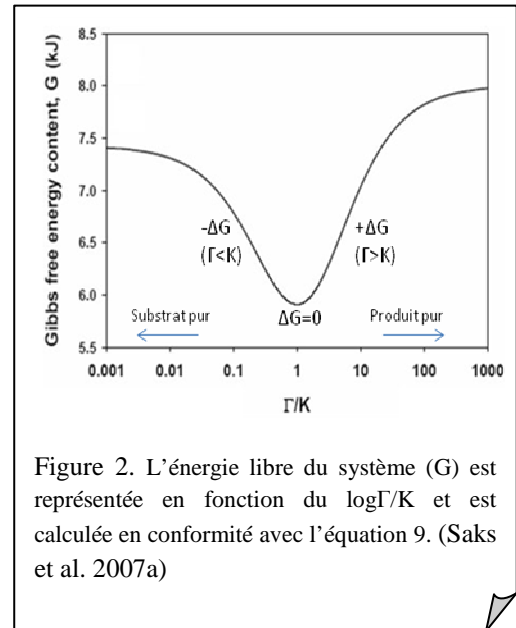


Figure 2. L'énergie libre du système (G) est représentée en fonction du $\log \Gamma/K$ et est calculée en conformité avec l'équation 9. (Saks et al. 2007a)

Dans ce cas, les variations de l'énergie libre (ΔG) et, respectivement, les forces motrices sont égales à zéro.

Lors d'une conversion du substrat A en produit P :

- la valeur de ΔG ($G_{\text{finale}} - G_{\text{initiale}}$) est négative si le rapport d'action des masse (Γ) est plus bas que la constante d'équilibre (K) (déviaton à gauche sur l'axe des abscisses), et
- elle est positive si $\Gamma > K$ (déviaton à droite sur l'axe des abscisses).

L'augmentation de l'entropie dans une réaction spontanée conduit à la diminution de l'énergie libre du système car

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (11)$$

et La thermodynamique classique ne peut pas décrire correctement les systèmes ouverts car les flux métaboliques à travers les interfaces du système avec l'environnement empêchent l'installation de l'équilibre à l'intérieur du système. Dans un système en équilibre, il n'y a pas de variation de l'énergie libre ni des forces motrices.

Une réaction hors équilibre est caractérisée par l'inégalité des vitesses des réactions (directe et inverse).

Tenant compte de l'expression du flux : $J_+ = k_1 \cdot [A]$ et $J_- = k_{-1} \cdot [P]$,

$$\Gamma = \frac{[P]}{[A]} = \frac{J_-}{J_+} \cdot \frac{k_1}{k_{-1}} \quad (12)$$

$$\frac{k_1}{k_{-1}} = K_{\text{eq}} \quad (13)$$

$$\Delta G = RT \ln \frac{J_-}{J_+} \quad (14)$$

Cette équation décrit la quantité d'énergie nécessaire au système pour maintenir la réaction en état stationnaire (concentrations constantes du substrat $[A]$ et du produit $[P]$) hors de l'équilibre (inégalité des flux ou des vitesses). En absence de travail, cette énergie peut être dissipée sous forme de chaleur pour augmenter l'entropie environnant le système. Ce principe est fondamental pour le concept des systèmes dissipatifs proposé par I. Prigogine (Prigogine

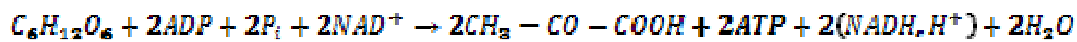
et Nicolis 1977). D'après Prigogine, les systèmes dissipatifs ont la capacité de compenser la tendance entropique croissante en consommant l'énergie et en l'employant pour exporter l'entropie vers leur environnement, de ce fait créant l'entropie négative ou néguentropie, qui empêche le système de se déplacer vers un état d'équilibre. Le système hors équilibre tend toujours vers l'équilibre. Le système vivant peut s'adapter, être relativement autonome et survivre dans l'environnement qui change constamment en acceptant la modalité des états stationnaires en dehors des états d'équilibre contrôlés par les mécanismes cinétiques.

3. L'extraction de l'énergie libre de Gibbs par les cellules musculaires : la synthèse de l'ATP

Les cellules musculaires extraient l'énergie libre de son environnement via le catabolisme des glucides (glycogène, glucose), des lipides (acides gras) et, exceptionnellement, des aminoacides.

Rappelle sur l'efficacité énergétique des sources du catabolisme

La glycolyse anaérobie :



La glycolyse aérobie nécessite l'oxydation du pyruvate dans les mitochondries :



$$\Delta H_{C_6H_{12}O_6} = 2854 \text{ kJ} \cdot \text{mole}^{-1}$$

(ΔH , l'enthalpie - quantité maximale de chaleur échangeable que le système peut produire (mesurée par calorimétrie))

L'oxydation aérobie des acides gras via la β -oxydation produit de l'Acetyl-CoA qui entre dans le cycle de Krebs :



$$\Delta H_{C_{16}H_{32}O_2} = 9791 \text{ kJ} \cdot \text{mole}^{-1}$$

La variation de l'énergie de Gibbs de synthèse de l'ATP (8 mM) en présence de 0,03 mM d'ADP, 1 mM de Pi en conditions physiologiques est de :

$$\Delta G_{ATP} = \Delta G_{ATP}^0 + RT \ln \Gamma = 32,200 + 2,3 \cdot 8,314 \cdot 310 \cdot \frac{\lg([ATP])}{[ADP][P_i]} = 60 \text{ kJ} \cdot \text{mole}^{-1}$$

(ΔG_{ATP}^0 - la variation de l'énergie de Gibbs standard de synthèse d'une mole d'ATP = 32,2 kJ·mole⁻¹)

L'efficacité énergétique $[(\Delta G_{ATP}/\Delta H) \cdot 100\%]$ de la :

glycolyse anaérobie = 4% ;

glycolyse aérobie = oxydation d'acide palmitique = 45%

Le contenu en énergie per unité de masse est 3 fois plus grand dans les lipides que dans les glucides (Newsholme et Start 1973).

3.1 La glycolyse

Le diagramme de la figure 3 représente le force motrice (ou ΔG standard par mole) de chaque étape de la glycolyse anaérobie qui permet l'extraction de $-80 \text{ kJ} \cdot \text{M}^{-1}$ d'énergie libre pour la synthèse de 2ATP et le stockage de l'énergie de l'oxydation de deux NADH et la production du pyruvate.

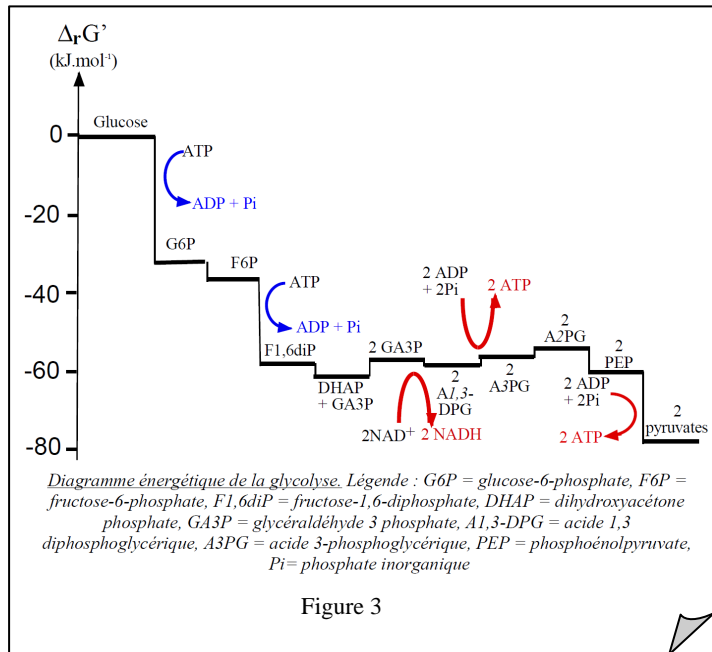
Les trois étapes de ces réactions (catalysés par l'hexokinase (HK), la phosphofructokinase et la

pyruvate kinase) sont exergoniques (elles s'accompagnent de la variation négative de l'énergie libre) : deux sont couplées à l'hydrolyse de l'ATP et la troisième à la déphosphorylation du PEP et de la phosphorylation de l'ADP. Lorsque l'origine du glucose-6-phosphate (G6P) est le glycogène et non pas le glucose (la situation habituelle pour le muscle squelettique), les étapes glycogène \rightarrow G1P \rightarrow G6P ne passent pas par la réaction de l'HK.

Le pyruvate issu de la glycolyse est transformé par le pyruvate deshydrogénase (PDH) mitochondriale en Acétyl-Coenzyme A avec la production d'un NAD^+ . L'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs. La β -oxydation des acides gras produit aussi de l'acétyl-CoA qui est également dégradé dans le cycle citrique. Au cours de la glycolyse anaérobie le pyruvate est converti en lactate par le lactate deshydrogénase (LDH).

3.2. La phosphorylation oxydative

L'énergie libre extraite par la glycolyse anaérobie ne permet pas à la cellule de réaliser un travail soutenu, supplémentaire à celui métabolique (anabolique). Pour assurer énergétiquement un travail soutenu et fluctuant (charges variées), les cellules musculaires oxydatives utilisent la phosphorylation oxydative qui se déroule dans la mitochondrie. Son rôle est de déplacer la réaction de synthèse de l'ATP au-delà de l'équilibre afin de permettre l'extraction plus efficace de l'énergie libre de Gibbs. La mitochondrie peut maintenir le rapport d'action de masse ($\Gamma = [\text{ATP}]/[\text{ADP}] [\text{Pi}]$) 10^{10} fois plus élevé que la constante de



l'équilibre ($K=10^{-5}M$, $\Gamma=10^5 M$) pour maintenir $\Delta G_{ATP} \sim 60 \text{ kJ}\cdot\text{mole}^{-1}$ (Nicholls et Ferguson 2002).

La mitochondrie forme un compartiment cellulaire où ont lieu des réseaux métaboliques comme par exemple le cycle citrique, la β -oxydation des acides gras, la chaîne de transporteurs des électrons, le transport des métabolites à travers la membrane mitochondriale interne, la synthèse de l'ATP.

Les mitochondries occupent environ 40 % du volume de la cellule cardiaque. Dans les cellules musculaires oxydatives, les mitochondries intermyofibrillaires ont un arrangement cytoarchitectural assimilable à un cristal permettant d'optimiser le transfert d'énergie (Vendelin et al. 2005). Une étude récente réalisée dans notre laboratoire (LBFA, Grenoble) a montré que les mitochondries des cellules cardiaques adultes (du rat) en conditions physiologiques normales ne sont pas soumises aux processus de fusion et fission (Beraud et al. 2009).

Les muscles squelettiques possèdent un contenu variable en mitochondries. Elles peuvent occuper un pourcent du volume cellulaire dans les muscles glycolytiques et jusqu'à 6 à 50 % dans les muscles oxydatifs (le 50 % est caractéristique des muscles pectoraux des oiseaux migrateurs). La structure interne des mitochondries est formée de deux membranes (membrane interne et membrane externe), délimitant un espace intermembranaire.

3.2.1. La membrane interne mitochondriale

Elle forme des replis appelés crêtes qui pénètrent à l'intérieur de la matrice afin d'augmenter sa superficie. Elle contient 30% de phospholipides, 70 % de protéines, dont des complexes protéiques de la chaîne respiratoire et différents transporteurs comme par exemple la TIM (Translocase of the Inner Membrane) qui assurent le transport des protéines en provenance des TOM (Translocase of the Outer Membrane), et les transporteurs qui font partis de la famille de transporteurs mitochondriaux (MCF – mitochondria carrier family) composée de:

- symports : H^+ /pyruvate translocase, $H^+/H_2PO_4^-$: transporteur du phosphate inorganique (H_2PO_4) ;
- antiport ANT (adenine nucleotide translocase) ; Na^+/Ca^{2+} antiport ; carnitine-acylcarnitine translocase (CACT) pour le transport des acides gras ;

- uniport de Ca^{2+} et d'autres (Figure 4)

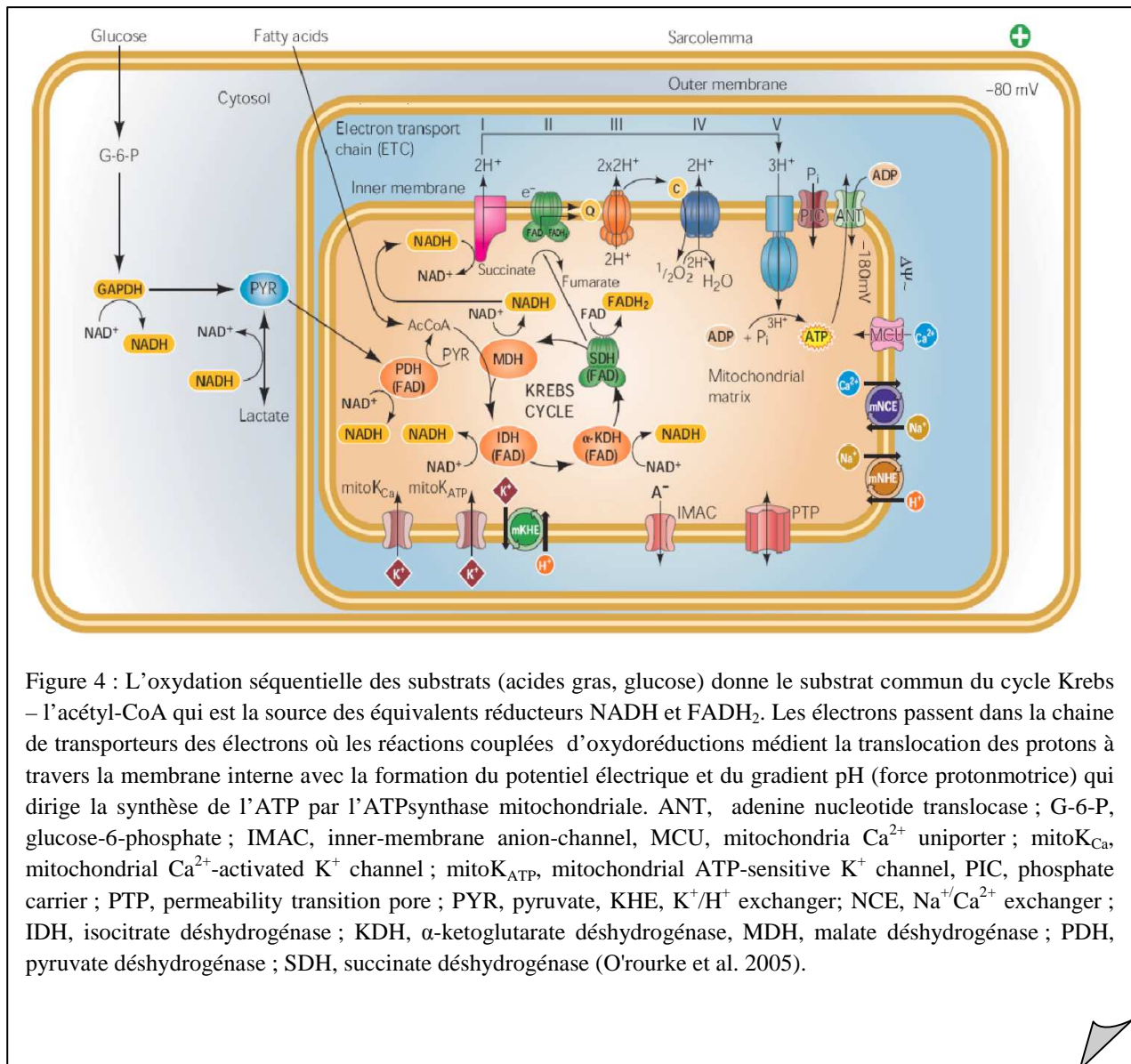


Figure 4 : L'oxydation séquentielle des substrats (acides gras, glucose) donne le substrat commun du cycle Krebs – l'acétyl-CoA qui est la source des équivalents réducteurs NADH et FADH_2 . Les électrons passent dans la chaîne de transporteurs des électrons où les réactions couplées d'oxydoréductions médient la translocation des protons à travers la membrane interne avec la formation du potentiel électrique et du gradient pH (force protonmotrice) qui dirige la synthèse de l'ATP par l'ATP synthase mitochondriale. ANT, adenine nucleotide translocase ; G-6-P, glucose-6-phosphate ; IMAC, inner-membrane anion-channel, MCU, mitochondria Ca^{2+} uniporter ; mitoK_{Ca} , mitochondrial Ca^{2+} -activated K^+ channel ; $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, mitochondrial ATP-sensitive K^+ channel, PIC, phosphate carrier ; PTP, permeability transition pore ; PYR, pyruvate, KHE, K^+/H^+ exchanger ; NCE, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger ; IDH, isocitrate déshydrogénase ; KDH, α -ketoglutarate déshydrogénase, MDH, malate déshydrogénase ; PDH, pyruvate déshydrogénase ; SDH, succinate déshydrogénase (O'rouke et al. 2005).

a. La chaîne des transporteurs d'électrons

La membrane interne comporte quatre complexes protéiques qui catalysent séquentiellement des réactions d'oxydoréduction et constituent la chaîne des transporteurs d'électrons (Figure 5). Elle est formée par plusieurs constituants protéiques associés à différents groupes prosthétiques d'oxydoréduction dont le potentiel augmente progressivement le long de la chaîne des transporteurs d'électrons. La chaîne des transporteurs d'électrons couple les réactions d'oxydoréductions à un mouvement transmembranaire des protons dans le sens inverse de leur potentiel. La variation de l'énergie

libre produit par le transfert d'une mole de proton en absence de la différence du potentiel électrique est exprimée par l'équation :

$$\Delta\mu = 2.3RT \lg \frac{[H^+]^i}{[H^+]^e} = -2.3RT \Delta pH \quad (15)$$

Le déplacement des protons (gradient transmembranaire en protons (ΔpH)) crée une charge positive à la surface externe de la membrane interne et une charge négative du coté de la matrice responsable de l'apparition d'un potentiel électrique ($\Delta\Psi$). Le gradient du potentiel électrochimique transmembranaire des protons ($\Delta\mu_{H^+_{i-e}}$) est exprimé par :

$$\Delta\mu_{H^+} = F\Delta\Psi - 2.3 \frac{RT}{F} \Delta pH \quad (16)$$

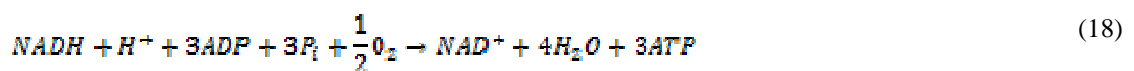
La variation de la force proton-motrice selon Mitchell est :

$$\Delta p = \frac{\Delta\mu_{H^+}}{F} = \Delta\Psi - \frac{2.3RT}{F} \Delta pH \quad (17)$$

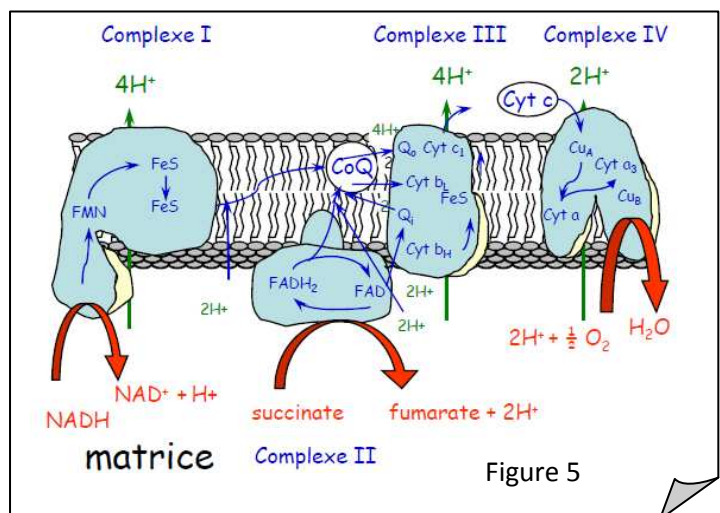
Par convention, le signe $\Delta\Psi$ est positif quand un ion est transporté du compartiment négatif (la matrice) vers le compartiment positif (l'espace intermembranaire) (Mitchell 1961).

Physiologiquement la membrane interne est imperméable aux protons. Néanmoins, une petite fuite de protons existe.

Le courant d'électrons induisant le mouvement transmembranaire des protons provient de l'oxydation du NADH et du FADH₂ produits lors du cycle de Krebs. NADH et FADH₂ suite à une séquence de réactions d'oxydoréduction transforment leur pouvoir réducteur en un potentiel de phosphorylation de l'ATP.



La réaction d'oxydation du NADH par le dioxygène ne s'effectue donc pas en une seule étape, mais passe par une chaîne de réactions redox. Le NADH cède des électrons non pas directement à l'O₂ mais à un couple redox qui se trouve au-dessus de celui composé par NAD⁺/NADH sur l'échelle des potentiels redox standard, le flavine mononucléotide (FMN) Fe-S du complexe I.



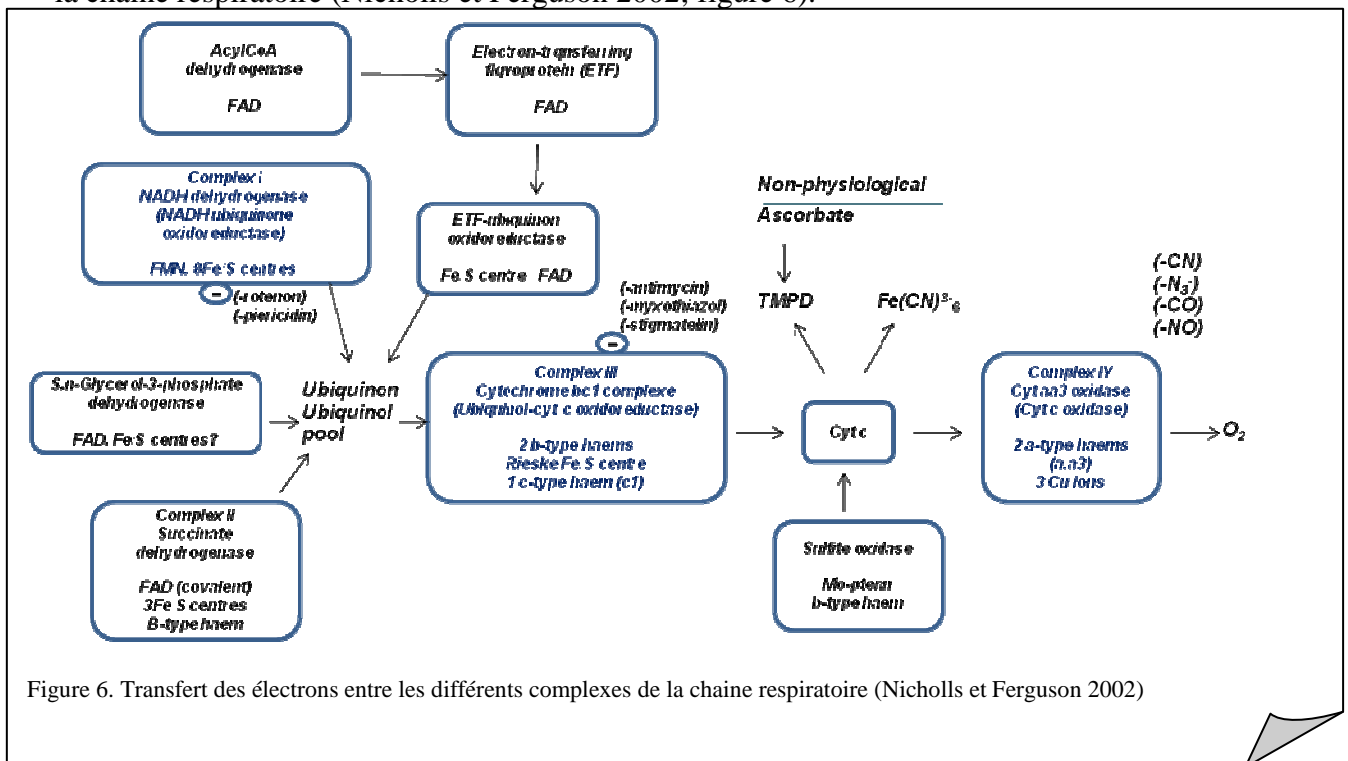
Complexe I : NADH-Coenzyme Q réductase (le groupe prosthétique d'oxydoréduction : FMN, avec 6 centres Fe/S). Il catalyse le transfert de deux électrons du NADH matriciel au Coenzyme Q.



L'expulsion des 4 protons de la matrice dans l'espace intermembranaire crée le gradient de protons.

Complexe II : Succinate – Coenzyme Q réductase (le groupe prosthétique d'oxydoréduction : FAD avec 4 centres Fe/S et un cytochrome b). Il catalyse le transfert des électrons du succinate au Coenzyme Q et accepte les deux électrons du succinate et catalyse la réduction du CoQ en CoQH₂. $\Delta G^0 = -2 \text{ kJ.mole}^{-1}$ Pour l'oxydation du succinate en fumarate, $\Delta G^0 = -2 \text{ kJ.mole}^{-1}$ ce qui ne permet pas d'y associer un transfert de H⁺.

La succinate déshydrogénase, la s,n,-glycérophosphate déshydrogénase et le complexe paradoxalement oublié, le flavoprotéine de transfert des électrons ubiquinon oxidoreductase (electron-transferring flavoprotein (ETF)-ubiquinon oxidoreductase, qui lie directement la β -oxydation des acides gras avec la chaîne respiratoire) délivrent les électrons directement dans la chaîne respiratoire (Nicholls et Ferguson 2002; figure 6).

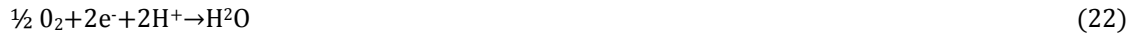


Complexe III : Coenzyme Q– cytochrome C réductase (1 centre Fe/S, 2 cytochrome b, un cytochrome c₁). Il catalyse le transfert des électrons du CoQH₂ au cytochrome C.



Les protons de CoQH_2 sont expulsés dans l'espace intermembranaire.

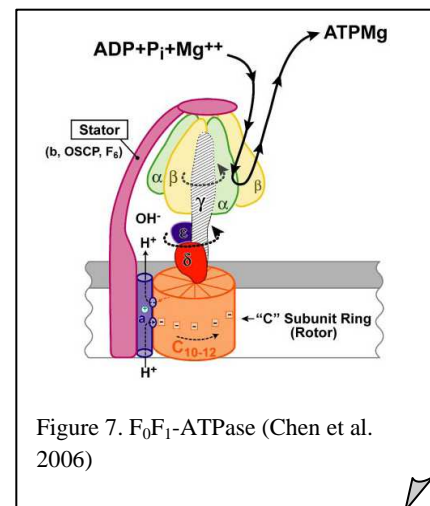
Complexe IV : Cytochrome C oxydase (2 cytochromes a et 2 atomes de Cu). Il catalyse l'oxydation de Cyt c réduit par l'oxygène moléculaire, qui est l'accepteur final des électrons de la chaîne de transporteurs des électrons.



Les deux protons nécessaires à la réduction de $\frac{1}{2} \text{O}_2$ sont appelés les protons substrat. Les deux autres protons sont expulsés par le complexe IV vers l'espace intermembranaire.

b. L'ATP synthase

L'ATP synthase (F_0, F_1) est un complexe protéique situé dans la membrane interne mitochondriale où il catalyse la réaction de synthèse de l'ATP à partir de l'ADP, Pi et le Mg^{2+} (Figure 7) grâce au gradient électrochimique de protons généré par la chaîne des transporteurs d'électrons (Pedersen et al. 2000). L'ATP synthase est formée de 15 sous-unités (Ko et al. 2000) : 5 sous-unités ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$) forment l'unité catalytique F_1 qui est le moteur de l'hydrolyse de l'ATP, les 10 autres sous-unités forment l'unité F_0 (une partie contenant les sous-unités a et c, incorporées dans la membrane interne pour former le moteur à protons (rotor) et une autre composée des sous-unités b (sensibles à l'oligomycine (oligomycin sensitivity conferring protein, OSCP) forment la tige ou « stator » qui s'étend du segment incorporé dans la membrane interne jusqu'au sommet du F_1 (Ko et al. 2000). Trois mécanismes successifs qui assurent le fonctionnement de l'ATP synthase sont:



incorporées dans la membrane interne pour former le moteur à protons (rotor) et une autre composée des sous-unités b (sensibles à l'oligomycine (oligomycin sensitivity conferring protein, OSCP) forment la tige ou « stator » qui s'étend du segment incorporé dans la membrane interne jusqu'au sommet du F_1 (Ko et al. 2000). Trois mécanismes successifs qui assurent le fonctionnement de l'ATP synthase sont:

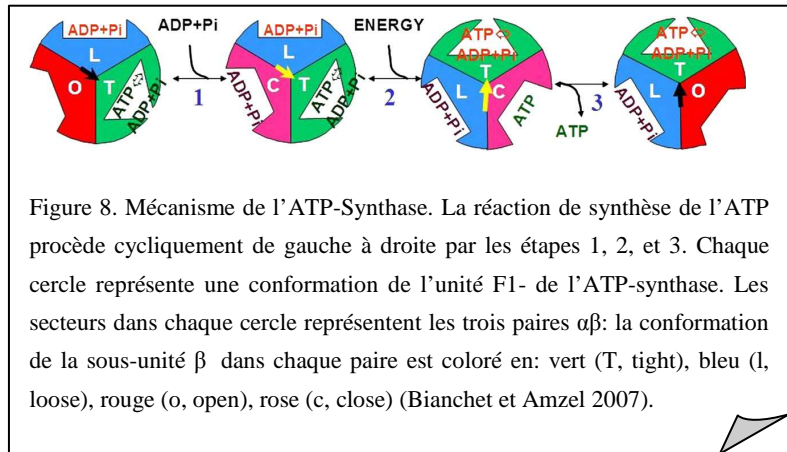
- Le rentrée des protons de l'espace inter membranaire dans la matrice induit la rotation de 12 sous-unités c et de la sous-unité γ grâce au gradient transmembranaire de protons,
- un mécanisme mécanique de couplage de la rotation de l'unité γ tous les 120° avec les modifications de la conformation de chaque paire de sous-unité β ,

- un mécanisme chimique de synthèse de l'ATP à partir de l'ADP, du Pi et du Mg²⁺ dans chaque sous-unité β (Boyer 1997, Chen et al. 2006, Omote et al. 1999, Pedersen et al. 2000).

A un instant donné, les trois sites sont occupés et sont dans des conformations différentes (Figure 8) :

1- départ de l'ATP situé dans le site de conformation O (open). L'ADP et le Pi se fixent spontanément sur ce site qui présente une faible affinité pour ces substrats.

2- rotation de la sous-unité γ et fermeture du site contenant les 2 substrats. Dans



cette conformation L « loose » le site est inactif et a peu d'affinité pour les substrats.

3- rotation de la sous-unité γ, le site L acquiert une conformation T « tight » à forte affinité pour les substrats. Ce site T est actif: il y a synthèse d'ATP et d'H₂O. La condensation de l'ADP et du Pi est spontanée et ne nécessite pas d'énergie.

4- le couplage de la rotation de la sous-unité γ avec le changement de conformation du site qui repasse dans sa conformation O: il y a ouverture du site, baisse de l'affinité pour l'ATP et libération d'ATP dans la matrice mitochondriale (figure Bianchet et Amzel 2007, Bianchet et al. 2000).

Quand le cycle de la F₀F₁-ATPase se déroule en sens inverse (de droite à gauche sur la figure 8), il couple l'hydrolyse de l'ATP à la génération d'un gradient de protons à travers la membrane interne. Pour empêcher ce processus, le TA2F1 (thermoalkaliphilic inhibiteur des protéines) forme le pont entre les sous-unités γ et β (étape 3), en favorisant la fermeture de la sous-unité β ce qui bloque le cycle catalytique d'hydrolyse de l'ATP (Stocker et al. 2007).

L'énergie libre du gradient électrochimique des protons utilisée pour la synthèse d'ATP à partir de l'ADP et du Pi en présence du Mg²⁺ (ADP + Pi + H⁺ → ATP + H₂O) est exprimée par l'équation :

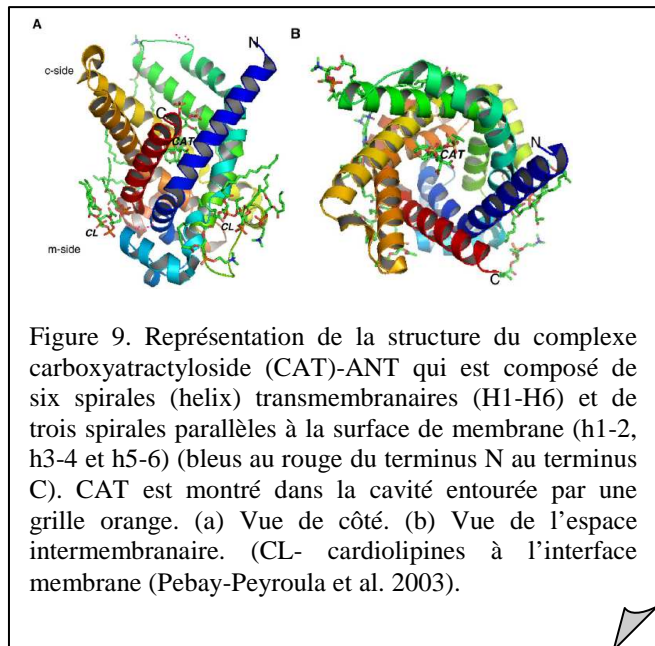
$$\Delta G = n \cdot \mu_{\text{H}^+}^+ \quad (23)$$

où n – est le nombre de protons transporté par F_0 pour la synthèse d'une molécule de l'ATP ; ($n \sim 3$). Pour la réduction d'une molécule d'oxygène sont utilisés 4 électrons et 20 protons sont transloqués ($2e^-/10H^+$). Donc l'efficacité de la phosphorylation ou le rapport P/O_2 est environ de 6 (Nicholls et Ferguson 2002).

c. L'ANT, le carrier de transport des nucléotides adényliques

Dans la cellule eucaryote, le transport de l'ADP/ATP à travers la membrane interne mitochondriale est une étape métabolique critique dans l'approvisionnement en ATP des processus intracellulaires (Klingenberg 2008). Le transporteur des nucléotides adényliques (adénine nucleotide translocator, ANT) est un des membres principal de la famille de transporteurs membranaires – antiporteurs – qui transporte les substrats (anioniques) à travers la membrane.

L'ANT a été cristallisé pour la première fois sous la forme d'un complexe avec le carboxyatractyloside (CAT) par un



groupe français de l'IBS à Grenoble, Eva Pebay-Peyroula en 2003. La protéine a la forme d'un entonnoir ouvert vers l'extérieur grâce à des hélices transmembranaires inclinées. La cavité contient de nombreux résidus chargés positivement (Figure 9).

Avant de connaître la structure de l'ANT, Klingenberg (1976), en utilisant le marquage des nucléotides adényliques endogènes avec 3H et exogènes avec ^{14}C , a montré l'existence d'un échange stœchiométrique des nucléotides adényliques ATP^{4-} et ADP^{3-} entre les espaces matriciel et intermembranaire de la mitochondrie (Klingenberg 1976). La translocation des nucléotides adényliques est un transport passif électrogène dirigé par le gradient électrostatique (Pebay-Peyroula et Brandolin 2004).

L'affinité de l'ANT pour l'ADP est autour de 1 à 10 μM et autour de 20 mM pour l'ATP (Jacobus et al. 1982). Il existe trois isoformes d'ANT : l'ANT1 (musculaire), l'ANT3 (ubiquitaire) humaines qui exportent l'ATP produit par phosphorylation oxydative

mitochondriale et l'ANT2 exprimée dans les cellules glycolytiques cancéreuses en prolifération qui est supposée importer l'ATP glycolytique dans la mitochondrie afin de maintenir le gradient de potentiel de la membrane interne et d'éviter l'apoptose (Chevrollier et al. 2005). La protéine a été décrite comme un monomère, son fonctionnement monomère/dimère fait l'objet de discussions. Klingenberg, décrit le fonctionnement de l'ANT comme un dimère dont son ouverture est dirigée vers la matrice (m) ou vers l'espace intermembranaire (c) (Klingenberg 2006).

Le transporteur catalyse la translocation du substrat à travers la membrane interne sans le modifier chimiquement (Figure 10). Le complexe transporteur-substrat change de conformation entre deux configurations de base, c et m, en passant par l'état de transition (ouverture et fermeture partielles des portes d'entrée et de sortie). L'ajustement de l'état de transition est induit par le substrat grâce à la diminution de l'énergie d'activation (ΔG^\ddagger) induite également par le substrat. Tout d'abord, la fixation du substrat au site de liaison libère un peu d'énergie en raison du faible ajustement de l'état de base. Avec l'avancement vers l'état de transition, les forces croissantes d'interaction substrat-protéine produisent l'énergie « intrinsèque » de liaison. La différence entre l'énergie du substrat et de l'état de transition (CT) forme le coût énergétique de la reconfiguration du transporteur. Ce coût est payé par l'énergie intrinsèque de liaison pour transférer le complexe de substrat-protéine dans l'état de transition. La différence d'énergie des états de transition du transporteur sans et avec le substrat correspond à l'« énergie catalytique » et est responsable de l'accélération de la fixation du substrat. En d'autres termes, l'énergie catalytique nécessaire pour le transport est recrutée à partir des forces d'interaction du complexe substrat-protéine atteignant son maximum dans l'état de transition.

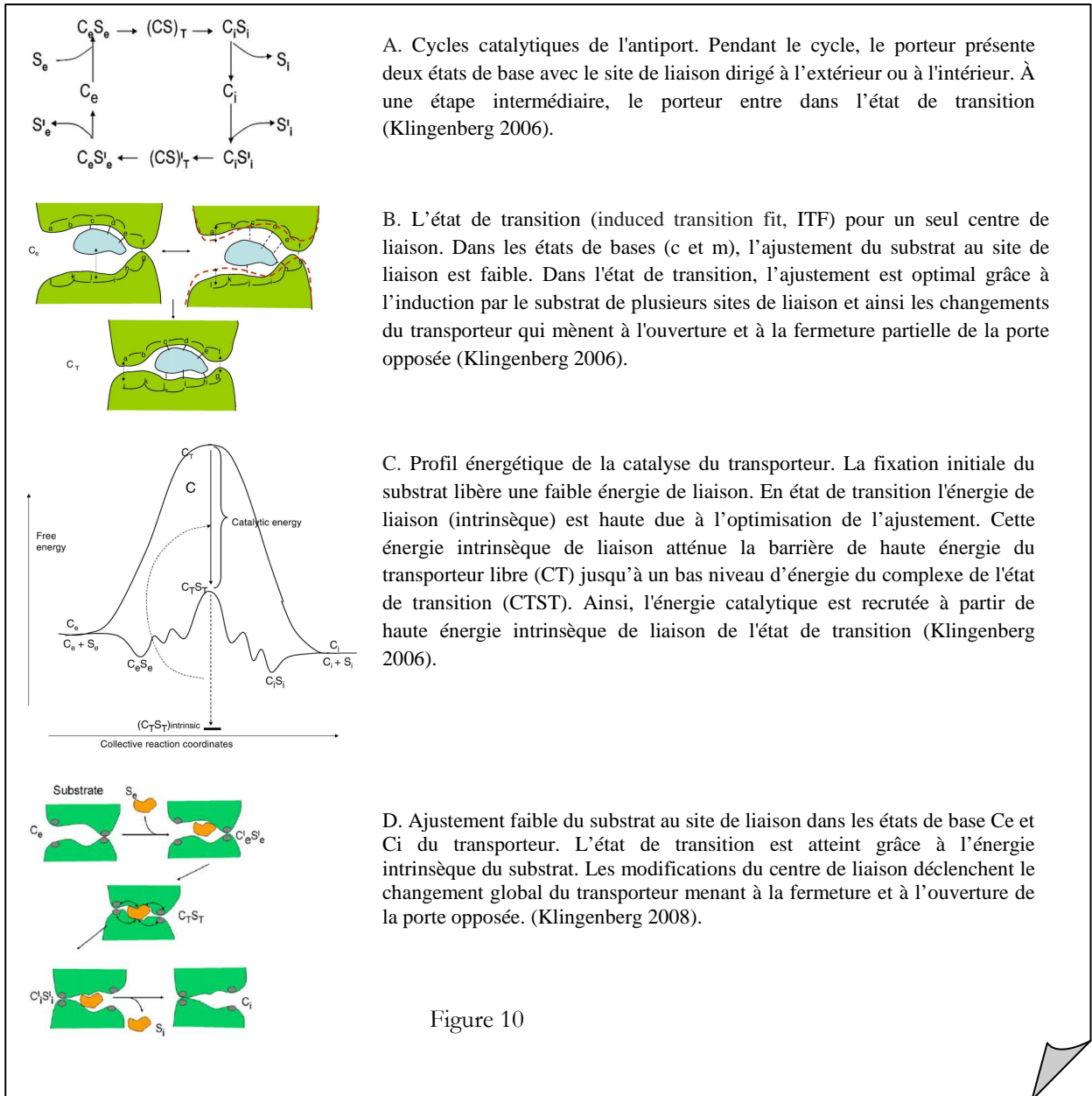


Figure 10

d. L'ATP synthasome

Young Ko et Chen (Chen et al. 2004, Ko et al. 2003) ont découvert que l'ATP synthase forme un supercomplexe avec deux transporteurs : le transporteur du Pi (PIC) et le transporteur des nucléotides adényliques (ANC, ou la translocase ANT). Ko a nommé ce supercomplexe (ATP synthase/PIC/ANC) ou ATP synthasome. Ce super

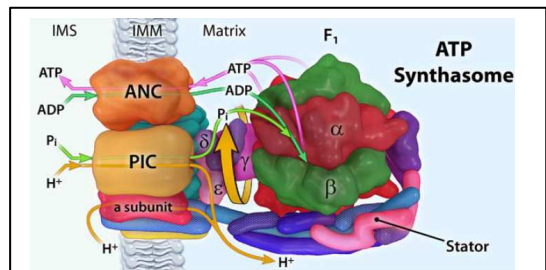


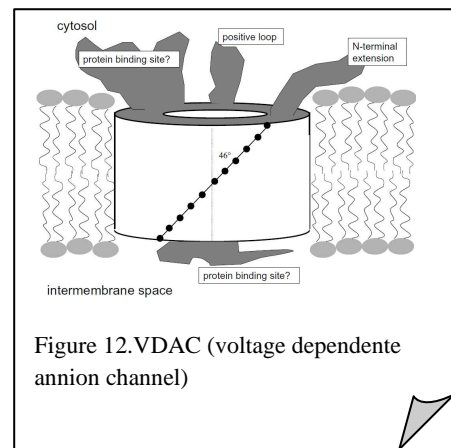
Figure 11. ATP-synthasome formé par l'ATP synthase, les carriers du Pi (PIC) et des nucléotides adényliques (ANC) (Pedersen 2007b).

complexe permet l'acheminement direct des ATP, ADP et Pi vers l'ATP synthase en facilitant la régulation de la synthèse de l'ATP.

3.2.2. La membrane mitochondriale externe

C'est une barrière sélective pour des métabolites, certaines protéines (qui peuvent passer via le transporteur de protéines TOM (translocase of the outer membrane), et ions. Par l'intermédiaire du contrôle du flux des métabolites énergétiques via le VDAC (voltage dependent anion channel), la MEM participe à la régulation de la phosphorylation oxydative (Colombini 1979).

Découvert en 1975, le VDAC est constitué d'un feuillet bêta de 18 brins antiparallèles replevés de manière à former un tonneau transmembranaire présentant une courte hélice alpha à son extrémité amino-terminale. Une boucle longue du côté du cytosol est proposée comme site de liaison pour les protéines du cytosquelette capables d'influencer sa perméabilité (Figure 12). Plusieurs candidats ont été proposés : l'actine G (Xu et al. 2001), le Bcl-XL (Vander Heiden et al. 2001), la chaîne légère de dynéine (Schwarzer et al. 2002), la protéine mtHSP70 (Schwarzer et al. 2002) et la tubuline (Monge et al. 2008, Rostovtseva et Bezrukov 2008, Rostovtseva et al. 2008).



En position ouvert, le VDAC est perméable prioritairement pour les anions et les métabolites chargés négativement (succinate, pyruvate, ADP, ATP, phosphate, etc.) et participe à la libération des protéines pro-apoptotiques : Bid, Bax, Bak (Korsmeyer et al. 2000). En position fermé, le VDAC devient sélectif pour les anions, les cations Na^+ et Ca^{2+} et est imperméable pour l'ATP (Rostovtseva et Colombini 1997, Rostovtseva et al. 2008).

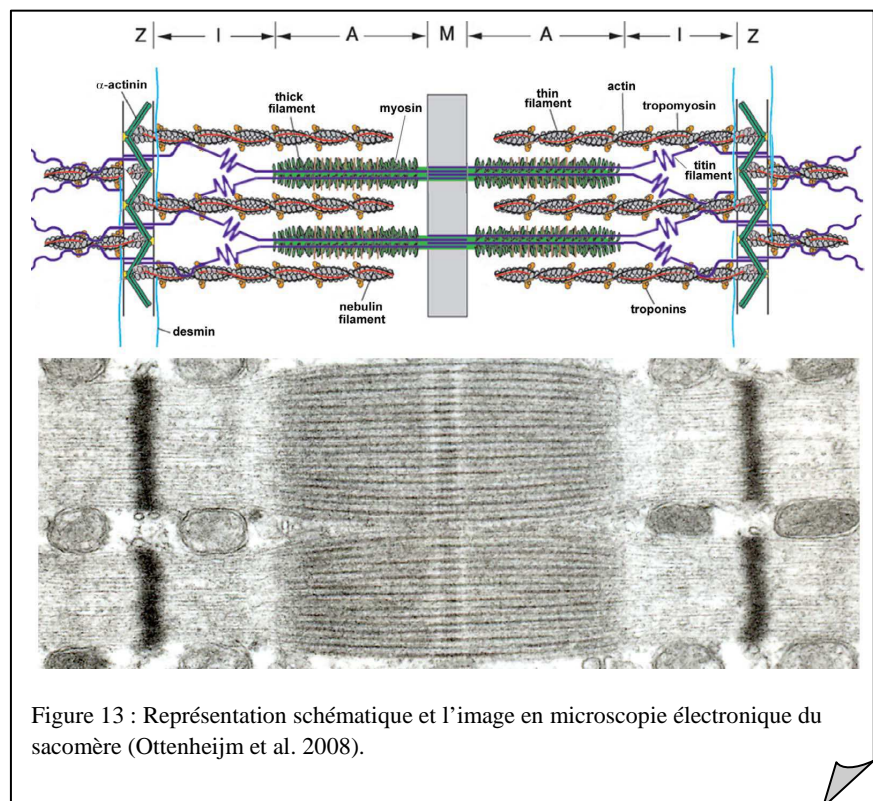
II. Le métabolisme énergétique intégré dans les cellules musculaires : lieu de transformation de l'énergie chimique liée au potentiel de phosphorylation en un travail mécanique

Dans la cellule musculaire 60% d'ATP est consommée pour la contraction musculaire.

1. La contraction musculaire

1.1. Le module contractile

L'unité contractile est représentée par la myofibrille, formée d'unités répétitives – les sarcomères (Figure 13). Chaque sarcomère est délimité visuellement par des bandes sombres A contenant myosine et actine et des bande I contenant seulement l'actine. La zone centrale (bande M) du sarcomère contient uniquement de la myosine. L'actine est fixée aux disques Z riches en l'alpha-actinine. La myosine est fixée à la ligne M au centre du sarcomère. Les bandes M, en dehors de la myosine, contiennent la protéine myomesine, la M-protéine et la partie C-terminale de la titine. La titine s'étale du disque Z vers la bande M où elle interagit avec la myomesine. Elle maintient la myosine dans sa position spatiale par le phénomène de l'espacement en treillis. La nébuline s'associe à l'actine, en limitant sa longueur.



La myosine est un moteur moléculaire qui transforme l'énergie libre de Gibbs (de phosphorylation) de l'ATP en énergie mécanique. Elle est formée de deux chaînes lourdes (MHC, 200 kDa), torsadées l'une autour de l'autre, et de 2-3 chaînes légères (MLC, 20 kDa). Chaque chaîne lourde comporte une tête globulaire pourvue de l'activité ATPasique et une

queue en hélice alpha. Les deux grandes classes d'isoformes de MHC caractérisant les propriétés cinétiques de contraction musculaire sont : les isoformes de type lent (MHC- β et α dans le myocarde et MHC-I dans le muscle squelettique) et les isoformes de type rapide (MHC-II dans le muscle squelettique) (Table 1).

Table 1	Muscle cardiaque	Muscle squelettique
Isoformes de type lent ou oxydatif	MHC-β : ventricule et MHC-α : oreillette chez l'Homme MHC-α : cœur de rat	MHC-I : soléaire
Isoformes de type rapide ou glycolytique		MHC-IIa et IIx : chez l'Homme MHC- Iia, IIx et IIb : chez le Rat

La plupart des muscles squelettiques, spécialement chez l'Homme, sont mixtes et composés de fibres oxydatives et glycolytiques.

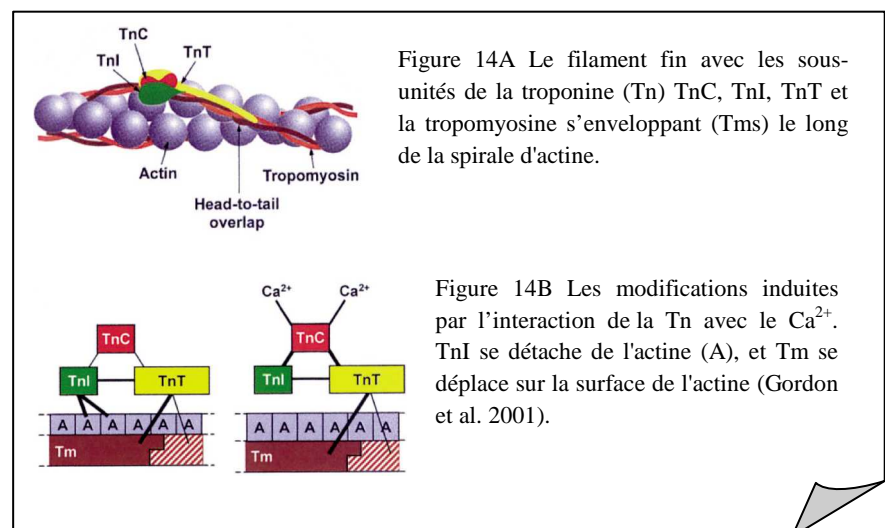
Les filaments fins ont un diamètre d'environ 7 nm et sont constitués de plusieurs types de molécules, l'actine, la tropomyosine et la troponine (Figure 14).

L'actine monomérique est une molécule globulaire de 42 kDa polymérisée en filaments. Deux filaments d'actine forment une double hélice en s'enroulant l'une autour de l'autre.

La tropomyosine (Tm) est une protéine allongée homodimérique ou hétérodimérique, chaque monomère étant constitué de 284 acides aminés adoptant une structure en hélice alpha qui s'enroule autour d'autre hélice de Tm pour former une superhélice.

La troponine est composée de 3 chaînes: la troponine-T (TnT), responsable de la liaison troponine-tropomyosine; la troponine-I (TnI) possédant une activité inhibitrice de l'activité ATPasique de la myosine ; et

la troponine-C (TnC) possédant 4 sites de fixation pour le calcium. La fixation du Ca^{2+} à la sous-unité TnC renforce l'interaction de TnC-TnI et détache TnI de ses contacts avec l'actine (Figure 14A, 14B) (Gordon et al. 2000, Solaro et Rarick 1998). Le détachement de la TnI de



l'actine par intermédiaire du Ca^{2+} - permet au Tm de se déplacer sur la surface du filament fin (Vibert et al. 1997, Xu et al. 1999).

La fixation du Ca^{2+} à la troponine (Tn) initie l'interaction de la myosine et l'actine. L'hydrolyse de l'ATP fournit l'énergie et génère la force motrice pour les changements moléculaires. La régulation de la contraction musculaire est donnée schématiquement dans la Figure 15 (Gordon et al. 2001).

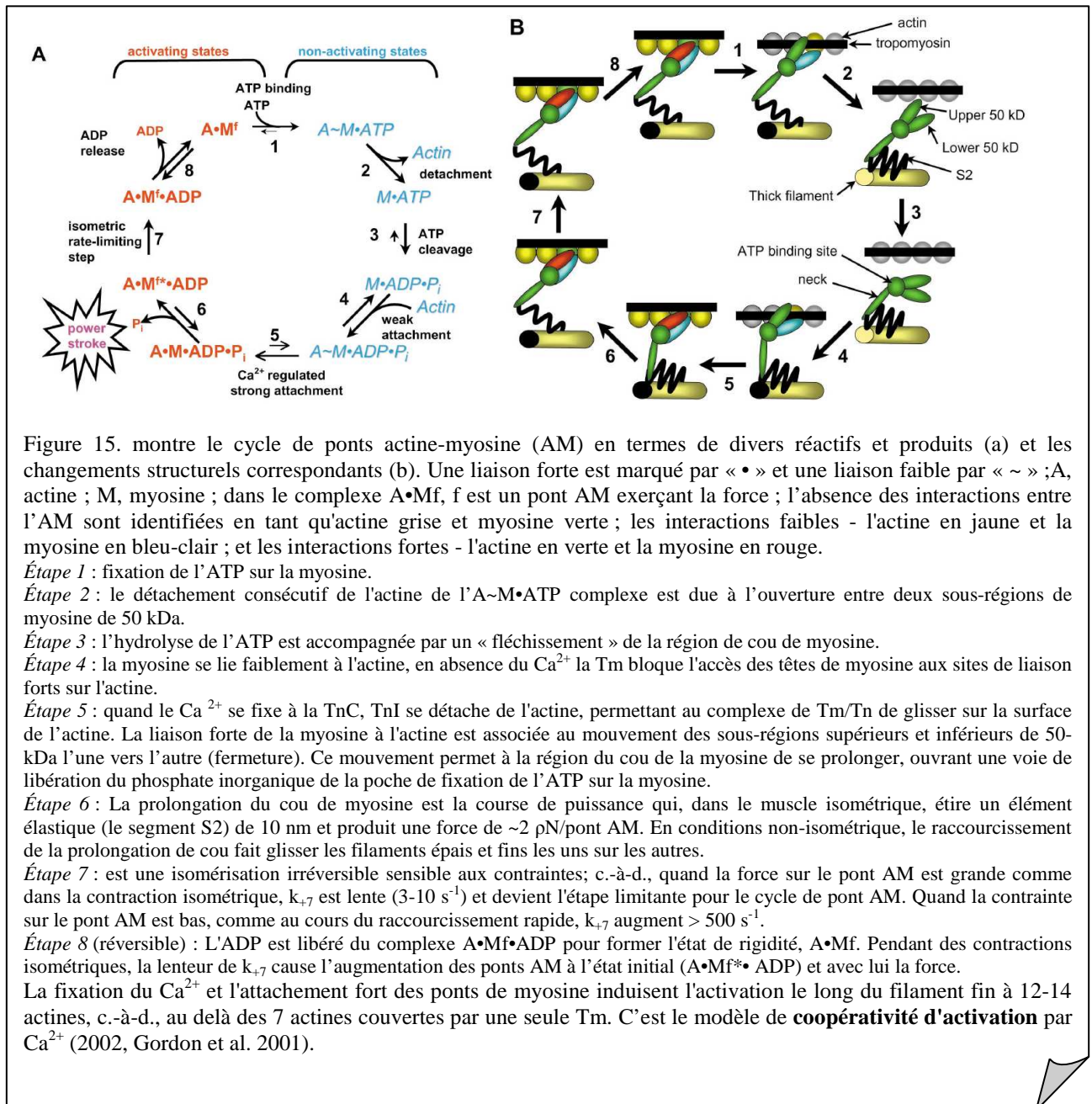


Figure 15. montre le cycle de ponts actine-myosine (AM) en termes de divers réactifs et produits (a) et les changements structuraux correspondants (b). Une liaison forte est marqué par « • » et une liaison faible par « ~ » ; A, actine ; M, myosine ; dans le complexe $A \cdot M^f$, f est un pont AM exerçant la force ; l'absence des interactions entre l'AM sont identifiées en tant qu'actine grise et myosine verte ; les interactions faibles - l'actine en jaune et la myosine en bleu-clair ; et les interactions fortes - l'actine en verte et la myosine en rouge.

Étape 1 : fixation de l'ATP sur la myosine.

Étape 2 : le détachement consécutif de l'actine de l' $A \sim M \cdot \text{ATP}$ complexe est due à l'ouverture entre deux sous-régions de myosine de 50 kDa.

Étape 3 : l'hydrolyse de l'ATP est accompagnée par un « fléchissement » de la région de cou de myosine.

Étape 4 : la myosine se lie faiblement à l'actine, en absence de Ca^{2+} la Tm bloque l'accès des têtes de myosine aux sites de liaison forts sur l'actine.

Étape 5 : quand le Ca^{2+} se fixe à la TnC, TnI se détache de l'actine, permettant au complexe de Tm/Tn de glisser sur la surface de l'actine. La liaison forte de la myosine à l'actine est associée au mouvement des sous-régions supérieures et inférieures de 50-kDa l'une vers l'autre (fermeture). Ce mouvement permet à la région du cou de la myosine de se prolonger, ouvrant une voie de libération du phosphate inorganique de la poche de fixation de l'ATP sur la myosine.

Étape 6 : La prolongation du cou de myosine est la course de puissance qui, dans le muscle isométrique, étire un élément élastique (le segment S2) de 10 nm et produit une force de $\sim 2 \text{ pN/pont AM}$. En conditions non-isométrique, le raccourcissement de la prolongation de cou fait glisser les filaments épais et fins les uns sur les autres.

Étape 7 : est une isomérisation irréversible sensible aux contraintes; c.-à-d., quand la force sur le pont AM est grande comme dans la contraction isométrique, k_{+7} est lente ($3\text{-}10 \text{ s}^{-1}$) et devient l'étape limitante pour le cycle de pont AM. Quand la contrainte sur le pont AM est bas, comme au cours du raccourcissement rapide, k_{+7} augment $> 500 \text{ s}^{-1}$.

Étape 8 (réversible) : L'ADP est libéré du complexe $A \cdot M^f \cdot \text{ADP}$ pour former l'état de rigidité, $A \cdot M^f$. Pendant des contractions isométriques, la lenteur de k_{+7} cause l'augmentation des ponts AM à l'état initial ($A \cdot M^f \cdot \text{ADP}$) et avec lui la force.

La fixation du Ca^{2+} et l'attachement fort des ponts de myosine induisent l'activation le long du filament fin à 12-14 actines, c.-à-d., au delà des 7 actines couvertes par une seule Tm. C'est le modèle de **coopérativité d'activation** par Ca^{2+} (2002, Gordon et al. 2001).

1.2. Le couplage Excitation-Contraction

L'évènement déclenchant la contraction musculaire est une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium (Figure 16). Au repos, cette concentration est

d'environ $0,1 \mu\text{M}$. Lors d'une stimulation, elle peut augmenter jusqu'à $1 \mu\text{M}$ soit 10 fois plus. La différence de potentiel transmembranaire des cellules cardiaques pacemakers, créée par la sortie du K^+ et l'entrée du Na^+ , induit l'ouverture des canaux voltage-dépendent et l'apparition du potentiel d'action sans intervention d'un neurone excitateur. Le potentiel d'action est

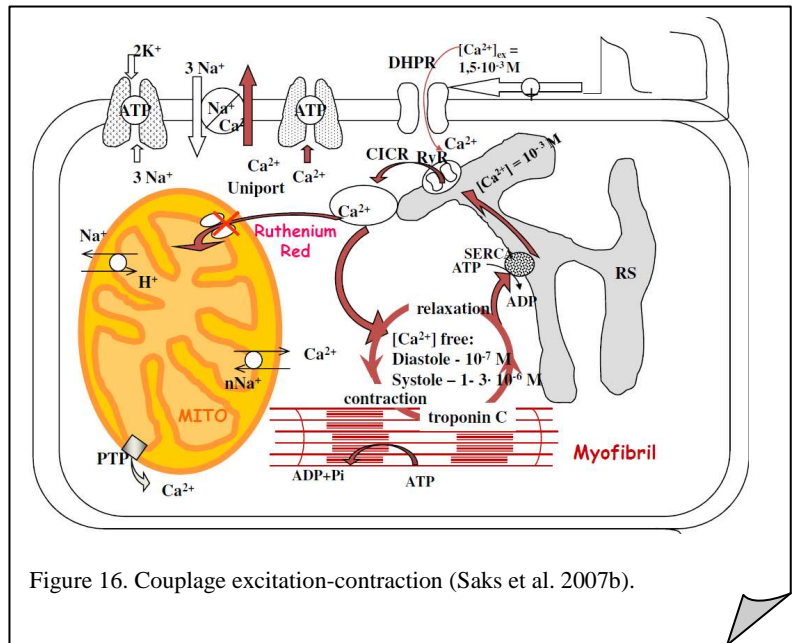
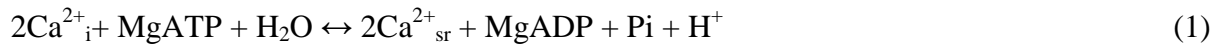


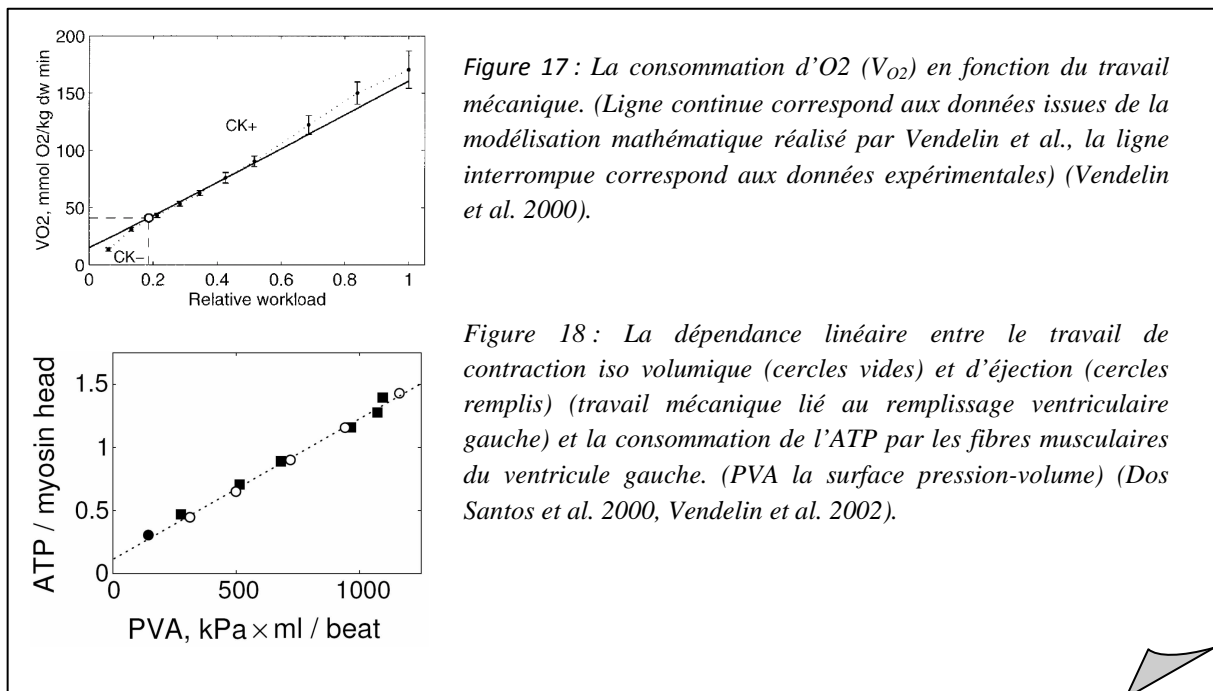
Figure 16. Couplage excitation-contraction (Saks et al. 2007b).

transmis aux autres cellules musculaires cardiaques reliées les unes aux autres par des jonctions communicantes (gap, reliant les cytoplasmes de deux cellules adjacentes par un pore protéique). La vague de dépolarisation de la membrane plasmique ouvre les canaux Ca^{2+} des récepteurs de dihydropyridines (DHP). Le flux des ions de Ca^{2+} déclenche l'ouverture des récepteurs ryanodine (RyR2 isoforme 2) du réticulum sarcoplasmique, entraînant la libération du Ca^{2+} par un mécanisme dite "Libération du Calcium Induit par le Calcium" (calcium induced calcium release, CICR). (Gordon 2001). La concentration intracellulaire en Ca^{2+} est dépendent du fonctionnement de quatre structures : l'influx du Ca^{2+} à travers le sarcolème, la libération et la séquestration du Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique, la liaison et la dissociation du Ca^{2+} de la troponine et les flux calciques mitochondriaux. La plupart du Ca^{2+} libéré dans le cytosol suite au potentiel d'action se fixe à la troponine. Moins d'un pourcent entre dans la mitochondrie et moins d'un pourcent reste en état libre dans le cytosol (Bers 2002, Yaniv et al. 2008). Le rôle du RS ne se limite pas à la libération du Ca^{2+} , mais il participe à l'évacuation du Ca^{2+} du milieu intracellulaire via la pompe ATP dépendante, la SERCA-ATPase du RS. La SERCA-ATPase transfère le Ca^{2+} dans le RS contre le gradient de concentration en utilisant l'énergie libéré par l'hydrolyse de l'ATP. Deux ions de Ca^{2+} sont transférés pour chaque ATP hydrolysé (Tran et al. 2009) en conformité avec l'équation :



1.3. La loi de Frank-Starling

La fonction contractile du myocarde est soumise à la loi de **Frank-Starling** énonçant que la force de contraction (tension active) augmente lorsque la pré-charge (tension passive) augmente. Si le volume de fin de diastole ventriculaire (pré-charge, remplissage ventriculaire) est augmenté, la longueur des fibres est elle aussi augmentée, ayant pour résultat l'amplification de la tension musculaire. De cette façon, le débit cardiaque est directement lié au retour veineux, le facteur de détermination le plus important de la pré-charge (Fukuda et Granzier 2005, Katz 2002, Saks et al. 2006b). L'interprétation métabolique de la loi de Frank-Starling est donnée par la représentation graphique de la consommation de l'O₂ en fonction du travail du muscle cardiaque (ou du remplissage ventriculaire gauche) calculé à partir des données expérimentales et de la modélisation mathématique Vendelin et al. 2000 (Figures 17 et 18).



La respiration du cœur isolé et perfusé mesurée en fonction du remplissage ventriculaire gauche montre que la respiration mitochondriale est une fonction linéaire du travail et peut augmenter 20 fois ($170 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g dry wt})^{-1}$) par rapport à l'état basal (sans charge, $V_{\text{O}_2}=8-12 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g dry wt})^{-1}$) (Williamson et al. 1976). Cette relation est à la

base de la loi de Frank-Starling. Par contre, le muscle squelettique peut augmenter la charge de son travail de 100 fois par rapport à l'état de repos.

Le mécanisme cellulaire principal sur lequel est basée la loi de Frank-Starling est **l'activation longueur-dépendante** du sarcomère (*length dependent activation, LDA*) découvert par Hibberd et Jewell (Hibberd et Jewell 1982). Ce principe dit que la force développée est une fonction de la longueur de la fibre musculaire au repos (Fukuda et Granzier 2005). P. De Tombe, en mesurant la force de la contraction Ca^{2+} -dépendante du muscle papillaire pour différentes longueurs du sarcomère, a montré qu'elle augmente en fonction de l'augmentation de la longueur du sarcomère (décalage vers la gauche sur la Figure 19) (Dobesh et al. 2002).

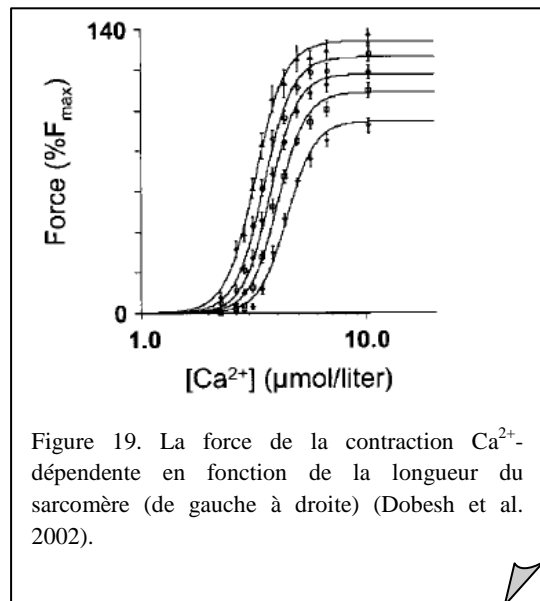


Figure 19. La force de la contraction Ca^{2+} -dépendante en fonction de la longueur du sarcomère (de gauche à droite) (Dobesh et al. 2002).

L'augmentation de la longueur du sarcomère est accompagnée d'une augmentation de la sensibilité au Ca^{2+} . L'équipe de Kobayashi et al., a montré que le flux transitoire de Ca^{2+} reste stable au cours de l'activation longueur dépendent du sarcomères (Kobayashi et Solaro 2005). L'augmentation de la longueur du myocyte dans ce cas est induite par la diminution de l'espace entre les filaments résultant de l'augmentation des ponts actine-myosine qui favorisent la force de contraction sans changement du niveau de Ca^{2+} . (Fukuda et Granzier 2005, Kobayashi et Solaro 2005). L'équipe de Moss, a été la premières à proposer le rôle de « l'espacement en treille » des filaments (lattice spacing) dans l'activation longueur-dépendante du muscle cardiaque (McDonald et Moss 1995). Granzier et Labeit ont montré qu'il existait des raccords entre la titine et l'actine au niveau de disque Z qui induisant des forces radiales et longitudinales (Figure 13). Les forces radiales contribuent à l'approchement plus étroit des filaments épais et fins en réduisant de ce fait l'espace entre eux (Granzier et Labeit 2004, Trombitas et Granzier 1997). La technique de la diffraction synchrotron des rayons X a montré que l'espacement en treillis de la fibre cardiaque intacte ou pelée diminue avec la longueur du sarcomère (Irving et al. 2000). De ce fait, la titine est responsable de la tension passive du muscle cardiaque liée à l'augmentation du volume ventriculaire par l'intermédiaire de la modulation de l'espacement en treillis entre les filaments (Figure 13).

La force passive créée par la titine peut tendre le filament épais, permettant le décalage des têtes de myosine du filament épais par rapport au filament fin (Fukuda et al. 2001). L'élongation du sarcomère induit une augmentation du nombre de ponts actine-myosine (AM) disponibles dans la région de recouvrement simple en augmentant le niveau d'activation. Cette augmentation du niveau d'activation induit une augmentation du nombre des ponts croisés et, via le mécanisme de retrocontrôle par coopérativité, augmentant l'affinité de la troponine pour le Ca^{2+} (Landesberg 1996).

L'activation longueur-dépendante est plus importante dans le muscle cardiaque que dans le muscle squelettique, probablement de l'expression différente de la titine dans le muscle cardiaque (Granzier et Labeit 2004).

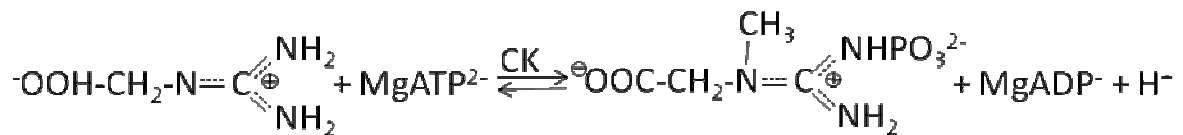
2. Le métabolisme énergétique intégré. Le réseau intracellulaire de transfert de groupes phosphoryles

2.1. La diffusion et la compartimentation de l'ATP

L'ATP est une molécule assez grande (500 Da), chargée négativement. Son hydrolyse est une réaction exergonique libérant en condition standard environ $-30,5 \text{ kJ}\cdot\text{mole}^{-1}$ pour former de l'ADP et $-42 \text{ kJ}\cdot\text{mole}^{-1}$ pour former l'AMP. L'ATP a plusieurs fonctions. Il peut être utilisée comme le précurseur du NAD^+ ou du coenzyme A et pour la synthèse des ARN. D'autre part l'épuisement total de l'ATP peut bloquer sa régénération car les réactions initiales de la glycolyse en consomment pour pouvoir en resynthéser (pour la formation de la G6P, de la F16biP). L'ATP ne peut pas être stocké ni délivré efficacement aux sites de son utilisation par simple diffusion libre. Il doit être synthétisée en continue. En revanche, la PCr dont l'hydrolyse est une réaction exergonique $\Delta G^0_{\text{PCr}} = -42,8 \text{ kJ}\cdot\text{M}^{-1}$, est une molécule plus petite et moins chargée que l'ATP, qui peut, donc, diffuser librement. La PCr est utilisée dans une seule réaction catalysée par la CK. Le transfert de la PCr et son interconversion avec l'ATP sont facilités par le phénomène de la compartimentation des différent isoenzymes de la créatine kinase (CK).

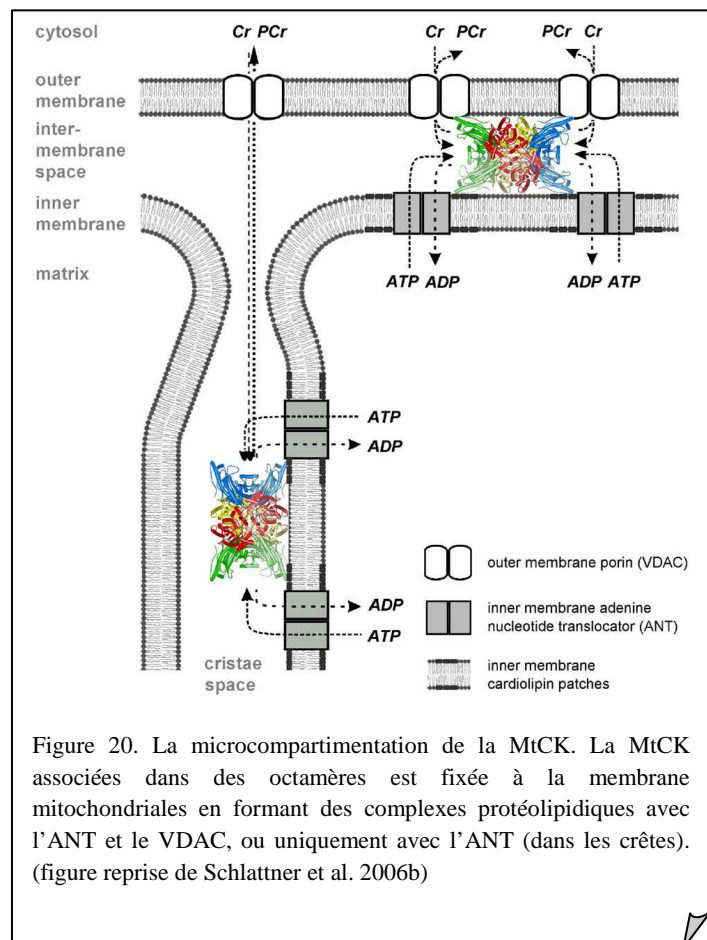
2.1.1. La créatine kinase mitochondriale (MtCK)

La créatine kinase (CK) appartient à la famille de phosphagène kinases (les composants de la guanidine phosphorylée : arginine kinase...) qui transfère le groupement phosphate (Pi) de l'ATP sur l'atome d'azote du groupe guanidine, aboutissant à la formation de la PCr, nommée antérieurement – phosphagène. Cette enzyme est présente dans les cellules ayant des besoins énergétiques élevés et variables. La CK catalyse le transfert réversible du groupement Pi du MgATP sur la créatine, libérant de la PCr du MgADP et un proton (McLeish et Kenyon 2006).



Il existe quatre isoenzymes de la CK: deux formes cytosoliques dimériques, MMCK (musculaires) et BBCK (du cerveau) et deux formes mitochondriales octamériques : sMtCK (sarcomérique) et uMtCK (ubiquitaire). Nous nous allons ici nous intéresser aux propriétés cinétiques de la CK mitochondriale sarcomérique (sMtCK). Dans les cellules musculaires squelettiques et cardiaques, la sMtCK est attachée sur la face externe de la membrane interne mitochondriale (Eppenberger-

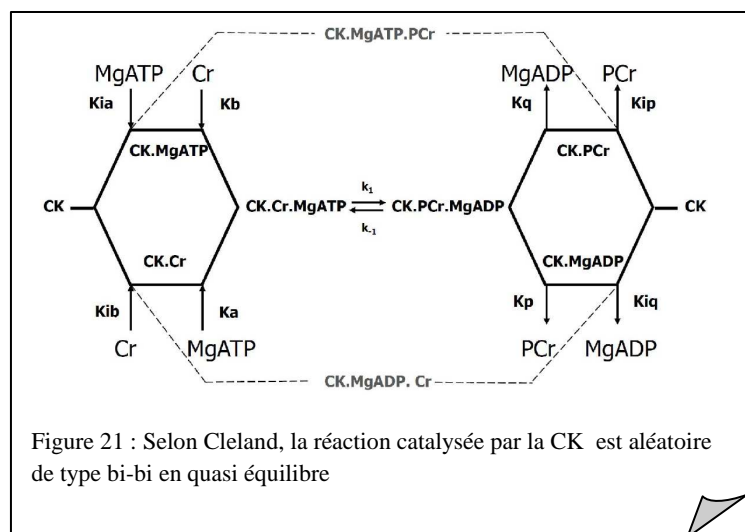
Eberhardt et al. 1991, Jacobus et Lehninger 1973, Kottke et al. 1994, Schlattner et al. 1998, Wegmann et al. 1992, Wegmann et al. 1991, Wyss et al. 1992). Elle forme des complexes protéolipidiques avec le VDAC et l'ANT (Figure 20). La MtCK forme un couplage fonctionnel avec l'ANT sans qu'il n'y ait d'interaction directe entre les deux (Saks et al. 1996, Saks et al. 2004, Smith et al. 2004, Wallimann et al. 1992). D'autre



part, ces deux protéines ont une grande affinité pour la cardiolipine et peuvent interagir entre elles (Schlattner et al. 2006b). *In vitro*, la MtCK rajoutée à une monocouche lipidique contenant de la cardiolipine induit des regroupements des molécules de cardiolipine en consolidant et en changeant la morphologie de la couche lipidique (Maniti et al. 2009). L'interaction électrostatique des résidus de la protéine C terminale chargés positivement (Schlattner et al. 2004) avec les cardiolipines chargés négativement (Schlame et Hostetler 1997, Schlattner et al. 2001, Vyssokikh et Brdiczka 2003) induit la stabilisation des site des contacts des deux membranes et influence la morphologie mitochondriale (Choi et al. 2007, Maniti et al. 2009, Nicolay et al. 1990). Le contact avec le VDAC est direct et est régulé par le Ca^{2+} (Schlattner et al. 2006b). Plusieurs études ont montré que la MtCK (et/ou l'HK II), l'ANT et le VDAC peuvent former des micro-compartiments (Speer et al. 2005, Wyss et al. 1992). Ces modules permettent l'acheminement direct des nucléotides adényliques entre la matrice et la MtCK sans dissipation dans le milieu, et d'exporter la PCr via le VDAC (Dolder et al. 2003, Kay et al. 2000, Ovadi et Srere 2000, Saks et al. 2004, Schlattner et Wallimann 2004, Schlattner et al. 1998, Schlattner et al. 2004, Vendelin et al. 2004a). Dans les crêtes la créatine et la phosphocréatine diffusent librement entre le VDAC et la MtCK car il n'existe pas de couplage fonctionnel entre les deux complexes protéiques.

Dans le couplage MtCK-ANT, l'ANT réalise le transfert des nucléotides adényliques pour saturer la MtCK en substrat MgATP (ATP en présence de Mg^{2+}) et pour transporter immédiatement l'ADP produit vers la matrice. Ainsi, la réaction n'atteint jamais l'état d'équilibre (Saks et Aliev 1996). De cette façon, l'acheminement métabolique réalisé grâce au couplage fonctionnel MtCK-ANT dirige la réaction catalysée par la MtCK dans le sens d'une production de PCr (Figure 21). En

analysant les caractéristiques énergétiques de la MtCK, il a été montré que la MtCK catalyse le transfert de groupement Pi et que l'échange d'énergie libre survient au moment de la formation et de la dissociation des complexes enzyme-substrats ou enzyme-produits (Jacobus et Saks 1982). En calculant les constantes de



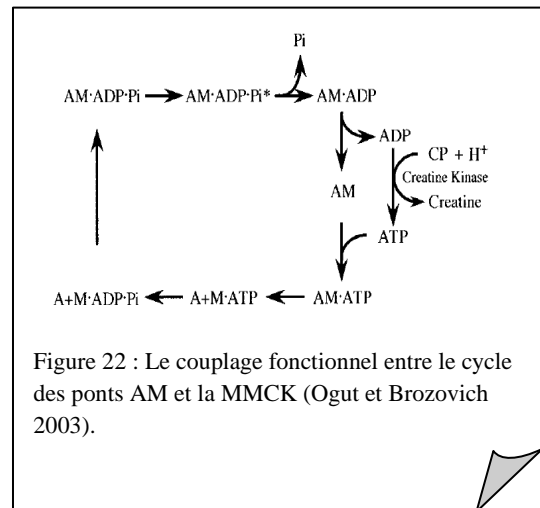
dissociations de l'ATP et de la créatine avec la MtCK, les auteurs ont montré que l'affinité de

la MtCK pour l'ATP augmente significativement en présence de la phosphorylation oxydative.

Une des conséquences de l'inhibition de l'activité de la CK est la diminution de l'énergie libre (ΔG) de l'ATP (Tian et Ingwall 1996, Tian et al. 1998). En outre, grâce au couplage fonctionnel et à son rôle dans la transphosphorylation, la MtCK participe à la prévention de l'augmentation de la perméabilité de transition mitochondriale et à la protection de la formation excessive des espèces radicalaires de l'oxygène par la mitochondrie (De Groof et al. 2001, Meyer et al. 2006, Wallimann et al. 2007).

2.1.2. Le couplage fonctionnel de la MMCK avec la myosine ATPases .

La bande M du sarcomère squelettiques et cardiaques contient une quantité importante de l'isoforme musculaire de la CK, la MM-CK interagissant avec la myomesine et la protéine M (Eppenberger-Eberhardt et al. 1991, Hornemann et al. 2003, Wegmann et al. 1992). La MMCK joue un rôle primordial dans le métabolisme énergétique du muscle en permettant de grandes fluctuations de la rephosphorylation de l'ADP. Dans la cellule musculaire, le contrôle par le substrat peut être

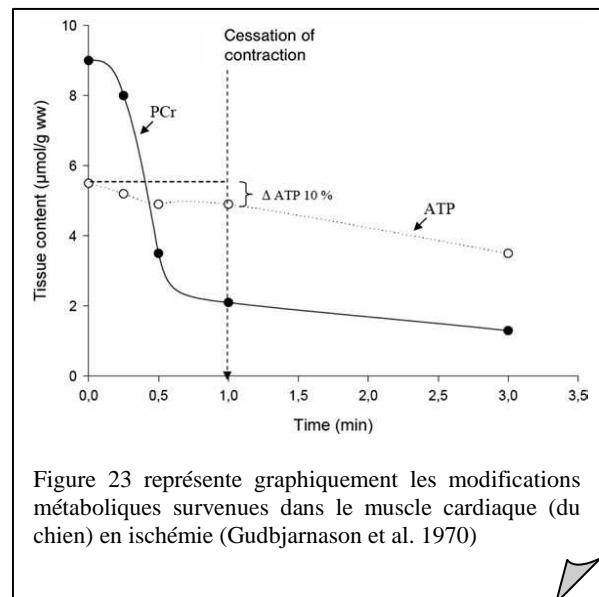


accompli grâce à la compartimentation sub-cellulaire. La MM-CK régénère localement l'ATP à partir de la PCr cytosolique et l'ADP issue de l'hydrolyse de l'ATP. L'ATP régénéré est transféré à l'ATPase de l'actine-myosine (Figure 22). En maintenant un rapport ATP/ADP élevé, la MMCK empêche la dissipation de l'énergie libre de Gibbs (Dzeja et Terzic 2003, Wallimann et al. 1992).

L'ATP n'est pas le facteur limitant de la réaction car son concentration intracellulaire *in vivo* est plus grande que le K_m apparent des ATPases des myosines pour l'ATP nécessaire pour générer la force maximale (150 μM) (Cave et al. 2000, Cooke et Bialek 1979). Par contre l'accumulation de l'ADP peut induire une diminution de la contractilité du muscle cardiaque via un ralentissement de la libération de l'ADP du complexe AM-ADP (Cooke et Pate 1985, Siemankowski et White 1984). L'ADP à haute concentration entre en compétition avec l'ATP pour la fixation sur l'actine-myosine en limitant le détachement des ponts AM (Lu et al. 1993). En présence de 5 mM ATP, l'augmentation de la concentration d'ADP de 2-

3 mM diminue le temps de relaxation de 19-23 % (Ogut et Brozovich 2003, Tesi et al. 2000). En utilisant les souris knockout, il a été montré que le détachement des ponts AM en état de rigidité était plus efficace en présence d'ATP et de la CK/PCr activée qu'en présence d'ATP seul (Ventura-Clapier et al. 1995). Les auteurs ont suggéré que l'ATP issu de la réaction de la CK est un substrat préférentiel pour le détachement de la myosine du site actine-myosine. A cette étape, l'AM devient disponible pour la liaison subséquente avec l'ATP et le détachement de la myosine. La libération de l'ADP du complexe AM·ADP et non pas la liaison de l'ATP à l'AM est l'étape limitante du cycle des ponts actine-myosine (Siemankowski et White 1984).

Alors que l'ADP semble exercer un effet dominant sur le ralentissement de la contractilité, l'accumulation de l'ADP au cours de l'ischémie cardiaque est modeste, $27 \mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ en 30 min. (Cave et al. 2000). L'accumulation excessive de l'ADP dans les myocytes est empêchée en partie par la CK qui catalyse sa rephosphorylation en utilisant la PCr cytosolique comme substrat. (Bessman et Carpenter 1985, Wallimann et al. 1992). L'importance de la CK dans la contractilité du muscle cardiaque est indirectement démontrée par le changement conséquent de la concentration en PCr observée au cours de l'ischémie. En effet, au bout d'une minute, le contenu en PCr chute de 80% et les contractions s'arrêtent, en présence de 90% de l'ATP cellulaire (Gudbjarnason et al. 1970, Figure 23).



2.2. Les réseaux du transfert du groupe phosphate (les navettes CK/PCr et l'AK)

2.2.1. La navette CK/PCr

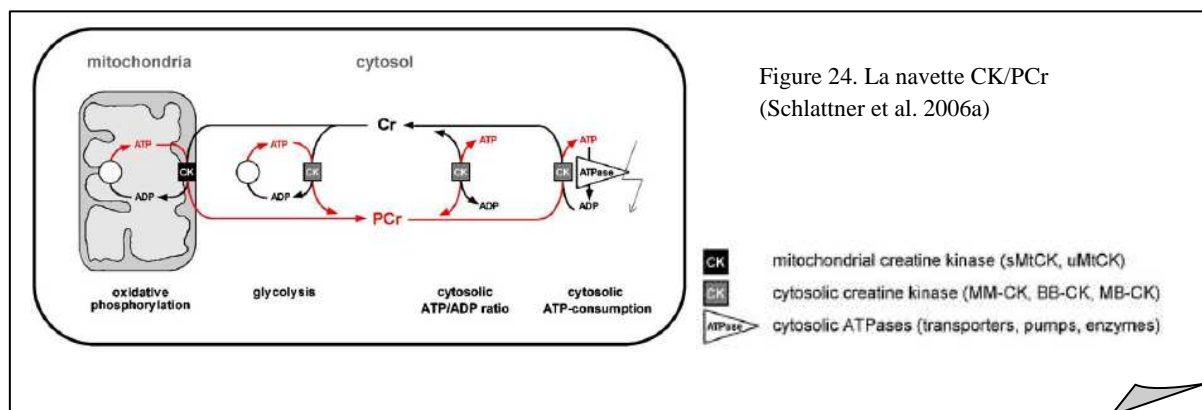
Le rôle de la créatine kinase ne se limite pas à tamponner les concentrations d'ADP et de l'ATP dans le cytosol. L'énergie libre de Gibbs de phosphorylation de l'ATP (ΔG_{ATP}) est transférés vers les sites d'utilisation sous la forme de la PCr via la « navette » CK/PCr (Wallimann et al. 1992) (Figure 24). L'hypothèse de la navette suppose l'existence de trois phénomènes:

- la restriction à la diffusion des nucléotides adényliques due à la micro-compartimentation intracellulaire,
- le couplage fonctionnel entre les enzymes et les transporteurs ayant pour résultat l'acheminement directe des produits et des substrats et,
- l'acceptation du fait que les réactions catalysées par la CK soient en état stationnaire loin de l'équilibre.

Le circuit de la CK/PCr aide:

- d'une part, à surmonter les barrières de diffusion dans la cellule (Abraham et al. 2002, Saks et al. 2004, Schlattner et Wallimann 2004, Selivanov et al. 2004, Vendelin et al. 2004b, Wallimann et al. 1992) et à éviter la dissipation de l'énergie due au transport de l'ATP
- et, d'autre part, à éviter accumulation de l'ADP (et donc l'inhibition de l'activité des ATPases en ré-phosphorylant l'ADP) et l'accumulation de l'AMP grâce à la réaction de l'AK (Dzeja et Terzic 2005).

Les sites de production et d'utilisation de l'énergie sont mis en relation par une série des réactions de la CK hors d'état d'équilibre ayant pour résultat le transfert presque instantané des groupement Pi vers les sites de demande et le signal métabolique de rétrocontrôle (Cr) vers la mitochondrie (Saks et al. 1994, Wallimann et al. 1992).



La compartimentation des réactions catalysées par les différents isoenzymes de la CK assurent un niveau élevé du rapport ATP/ADP au voisinage des ATPases et un niveau bas de ce rapport au voisinage de l'ANT. L'inhibition non sélective de l'activité de la CK (du cœur de rat isolé) par l'iodoacetamide induit une diminution de 50% de la contraction (Hamman et al. 1995). La substitution dans la nutrition des rats de la créatine avec son analogue, le guanidopropionate ou le guanidiobutyrate induit une déplétion de 80% de la phosphocréatine, accompagnée par une augmentation marquée de la concentration en ADP libre, une diminution du potentiel de phosphorylation de l'ATP, et une chute de 45 % de la capacité

contractile du cœur (Zweier et al. 1991). Les souris knockout pour la CK perdent la capacité d'effectuer un exercice (Abraham et al. 2002, Gorselink et al. 2001, Janssen et al. 2000, Van Deursen et al. 1993). Chez les souris knockout pour la MtCK et la MMCK une réorganisation cellulaire est observée, caractérisée par une augmentation en volume et un rapprochement des mitochondries des sites d'utilisations de l'ATP pour augmenter l'efficacité du métabolisme énergétique (Ventura-Clapier et al. 1995). La resynthèse de la PCr et son transfert via le système des CK (le flux du PCr) diminuent lors d'une insuffisance cardiaque (Nakae et al. 2003, Neubauer 2007, Ten Hove et Neubauer 2007, Weiss et al. 2005)

2.2.2. La navette adénylate kinase

La navette CK/PC est considérée comme la voie la plus importante de transfert « d'énergie » dans la cellule musculaire. Néanmoins, ce n'est pas la seule (Figure 25). Le transfert du groupement phosphorylé dans la cellule musculaire est possible par l'intermédiaire de l'adénylate kinase (AK), de l'hexokinase (HK), et des réactions couplées de la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase/3-phosphoglycerate kinase (GAPDH/PGK) (Dzeja et al. 1998, Dzeja et al. 2004, Dzeja et al. 1999). Les mesures des flux de transfert des groupements phosphates par la CK et par l'AK en utilisant le marquage par l'¹⁸O-phosphoryle indiquent que la majorité de molécules d'ATP formées utilisent la navette de transfert des groupements phosphates de la CK et/ou de l'AK (Dzeja et al. 1996). L'AK facilite le transfert et l'utilisation des groupes phosphorylés β et γ -de l'ATP, et fournit une voie additionnelle énergétique alternative en condition de stress métabolique (Dzeja et al. 1998, Dzeja et al. 1999). L'AK a été considérée, comme un élément importante en adaptation au stress quand d'autres systèmes énergétiques échouent (Dzeja et al. 1999). Les isoformes d'AK, AK2 et AK3, et la nucleoside diphosphate kinase (NDPK), situés dans le cytosol participe au transfert des groupes phosphates. Les réactions de phosphotransfer catalysées par la CK et l'AK couvrent jusqu'au 90% du turnover total de l'ATP (Dzeja et al. 2004). Environ de 10-15 % des groupements phosphorylés sont transportés par le système de l'AK et le système glycolytique, spécialement dans l'augmentation du travail et dans l'insuffisance cardiaque (Dzeja et Terzic 2003, Dzeja et al. 1998, Dzeja et al. 2004, Janssen et al. 2000, Pucar et al. 2001, Wallimann et al. 1992). Il existe une interaction et une compartimentation des systèmes de transfert des groupements phosphorylés (Neumann et al. 2003).

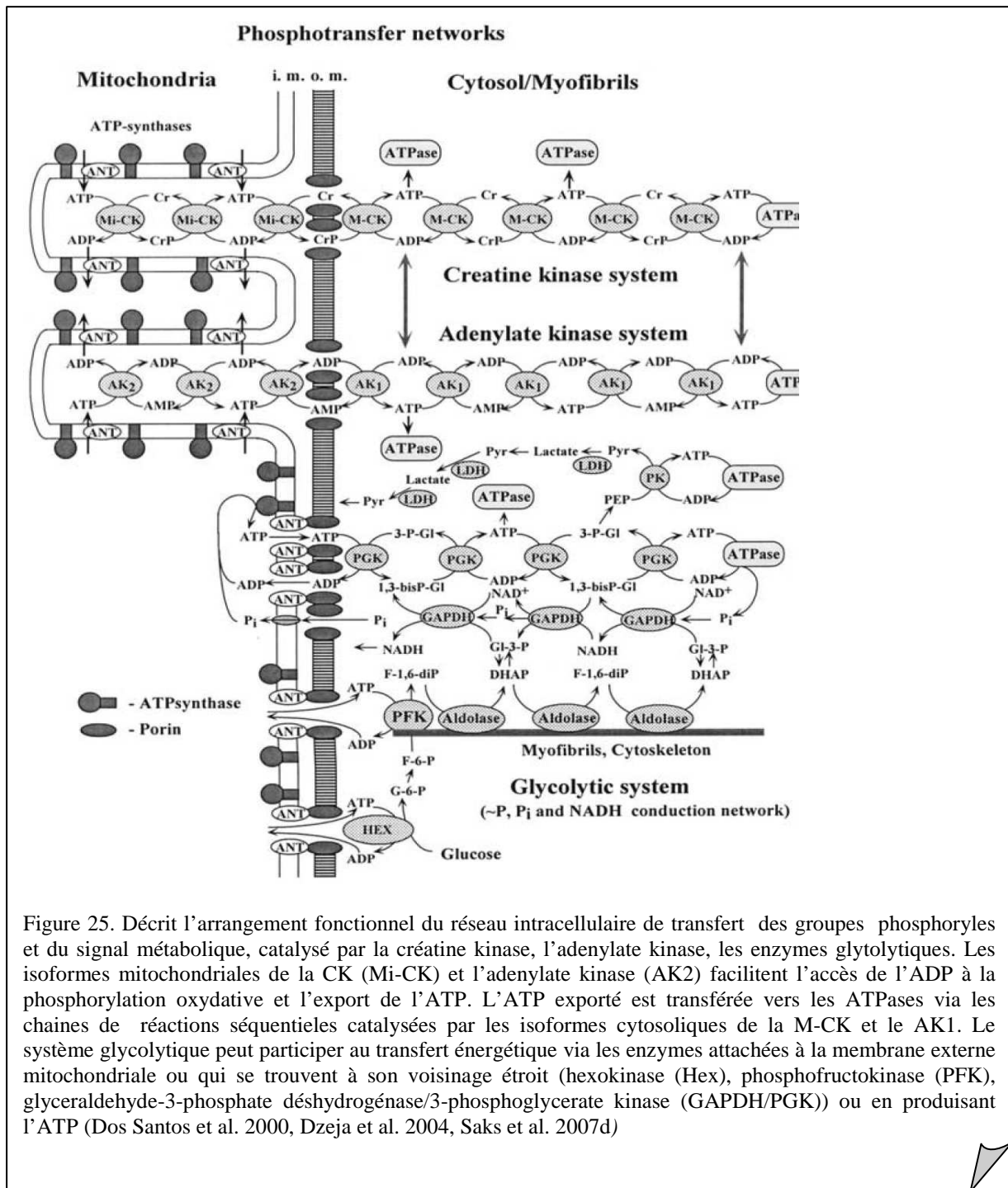


Figure 25. Décrit l'arrangement fonctionnel du réseau intracellulaire de transfert des groupes phosphorylés et du signal métabolique, catalysé par la créatine kinase, l'adenylate kinase, les enzymes glycolytiques. Les isoformes mitochondriales de la CK (Mi-CK) et l'adenylate kinase (AK2) facilitent l'accès de l'ADP à la phosphorylation oxydative et l'export de l'ATP. L'ATP exporté est transférée vers les ATPases via les chaînes de réactions séquentielles catalysées par les isoformes cytosoliques de la M-CK et le AK1. Le système glycolytique peut participer au transfert énergétique via les enzymes attachées à la membrane externe mitochondriale ou qui se trouvent à son voisinage étroit (hexokinase (Hex), phosphofruktokinase (PFK), glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase/3-phosphoglycerate kinase (GAPDH/PGK)) ou en produisant l'ATP (Dos Santos et al. 2000, Dzeja et al. 2004, Saks et al. 2007d)

3. Le module énergétique

La bioénergétique moléculaire des systèmes a évolué de la recherche du « substrat » énergétique à l'étude des réseaux métaboliques énergétiques hautement structurés et régulés. Un exemple de concept scientifique basé sur les connaissances cumulées par la biologie analytique est celui des *Unités Énergétiques Intracellulaire (IntraCellular Energetic Units, ICEU)*, proposé en 2001 par **Valdur Saks**. Ce concept intègre l'organisation structurale et fonctionnelle du métabolisme énergétique de la cellule cardiaque adulte (Figure 26). Structurellement, l'ICEU comporte les mitochondries qui consomment de l'ADP pour régénérer de l'ATP et les systèmes d'utilisation de l'ATP: les Mg-ATPases myofibrillaires, Ca²⁺-ATPases du réticulum sarcoplasmique, les Na⁺/K⁺-ATPases du sarcolemme. L'ADP produit dans ces unités ne s'équilibre pas avec l'ADP du cytoplasme. Aux seins de ces unités fonctionnelles, l'énergie du potentiel de phosphorylation et le signal métabolique de rétrocontrôle sont transférés par l'intermédiaire de réseaux d'enzymes couplées (Dzeja et al. 2004, Saks et al. 2001). Le rôle des ICEU ne se réduit pas à l'ajustement entre l'utilisation et la régénération de l'ATP pour assurer le travail mécanique, métabolique ou de transport des ions. Son rôle est fondamental car on peut dire qu'en conformité avec la théorie des structures dissipatives de Prigogine, les ICEU extraient l'énergie libre de Gibbs ou la néguentropie (d'après Schrödinger) de son environnement pour augmenter le niveau d'organisation interne et donc notre survie. L'ICEU vu comme un « réseau métabolique dissipatif » (De La Fuente et al. 2008) est un système dynamique hors d'équilibre constitué des sous-réseaux enzymatiques dissipatifs (la glycolyse, le cycle de Krebs, l'oxydation d'acide gras, la chaîne des transporteurs des électrons, les navettes créatine kinase/phosphocréatine, malate/aspartate, etc.) structurés et reliés ensemble par des flux et des signaux de régulation. L'association de diverses enzymes au sein de grands complexes permet le transfert direct de leurs métabolites intermédiaires communs (acheminement métabolique). De plus, les interactions réversibles des enzymes avec les protéines structurées dans les membranes favorisent la formation des micro-compartiments dans les phases solubles des cellules.

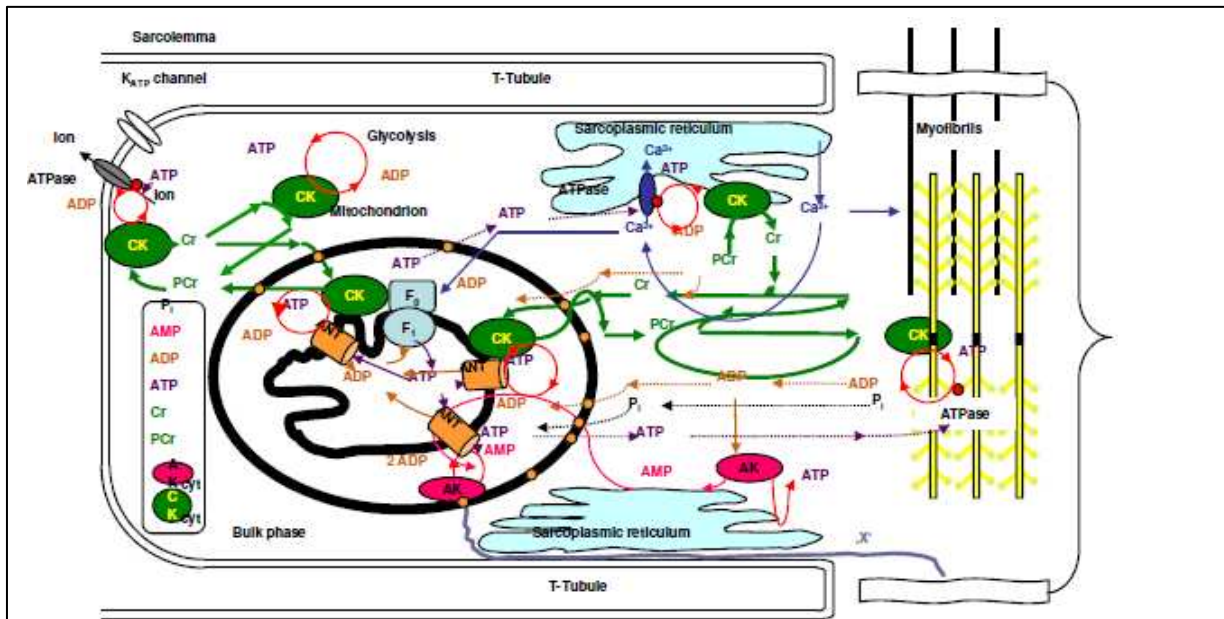


Figure 26. L'unité énergétique intracellulaire (Intracellular Energy Units, ICEU) est une organisation structurale et fonctionnelle formée par les sites de production de l'ATP (mitochondrie) et d'utilisation de l'ATP (les ATPases de la myosine, du réticulum sarcoplasmique, des pompes ioniques sarcolemmales) réunis par le réseaux de transfert des groupes phosphoryles via le système des isoenzymes compartimenté de la créatine kinase (Saks et al. 2001).

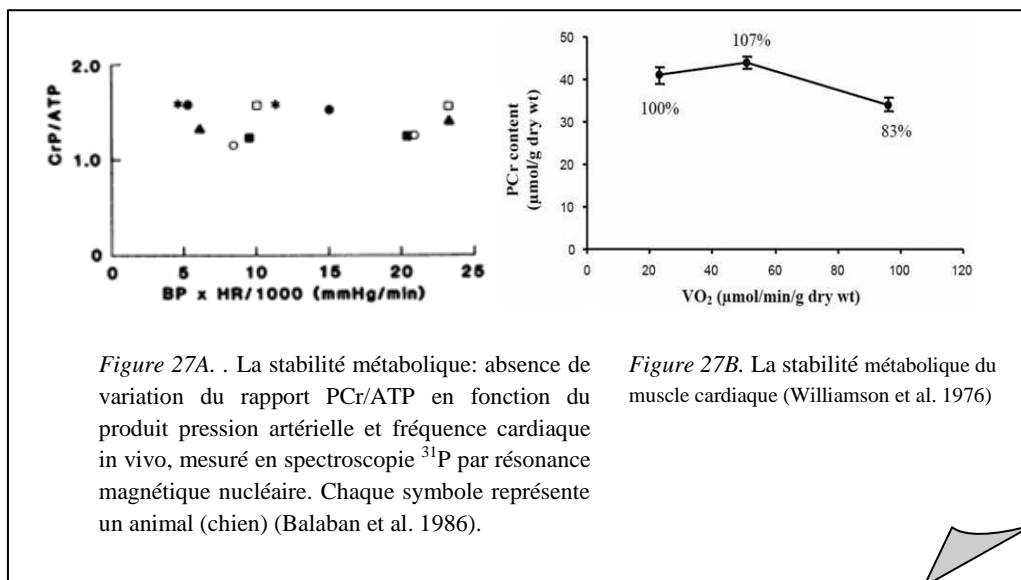
III. La régulation de la respiration mitochondriale dans les cellules musculaires

1. Les théories de la régulation de la respiration mitochondriale

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la régulation de la respiration mitochondriale responsable de la stabilité métabolique du cardiomyocyte:

1.1. Le phénomène d'homéostasie (stabilité) métabolique

Malgré la multitude et la longue durée des recherches menées jusqu'à aujourd'hui, il n'existe toujours pas d'accord scientifique unanime sur les mécanismes de régulation du métabolisme énergétique responsables de l'ajustement de la synthèse de l'ATP à sa demande dans les cellules musculaires. L'application directe de la théorie du contrôle respiratoire par



l'ADP pour la régulation *in vivo* est devenue difficile suite au découvert de Neely et al. 1972, (confirmé ensuite par Williamson et al. 1976, Balaban et al. 1986) du phénomène de stabilité métabolique. Ce phénomène caractérise la stabilité de la concentration intracellulaire de la PCr et de l'ATP et de ses produits d'hydrolyse, l'ADP et le Pi, dans le muscle cardiaque au cours du changement de la charge de travail, autrement dit, en présence d'une hydrolyse variable de l'ATP (Figure 27A et B). (Balaban et al. 1986, Detre et al. 1990, Katz et al. 1989).

1.2. La théorie de l'équilibre de la réaction CK

Le rôle de la créatine kinase dans le métabolisme énergétique de la cellule musculaire est indiscutablement accepté aujourd'hui par la communauté scientifique, mais pas toujours à sa juste valeur. En effet, le rôle de la PCr est souvent réduit au rôle de tampon temporel de l'énergie. La réaction catalysée par les différents isoformes de la CK est parfois considérée par certains comme étant une réaction à l'équilibre se déroulant dans un milieu cellulaire homogène (Beard 2006, Jeneson et al. 2000, Jeneson et al. 1996, Korzeniewski 2007, Kushmerick et Conley 2002, Mcfarland et al. 1994, Meyer et al. 1984, Van Beek 2007, Wu et al. 2008). Cette supposition a été utilisée pour estimer la concentration de l'ADP, de l'énergie libre de l'hydrolyse de l'ATP et pour étudier les mécanismes de régulation des flux d'énergie dans les cardiomyocytes en état physiologique et pathologique (Jeneson et al. 2000, Wu et al. 2008). En assumant ce concept il devient difficile ou pratiquement impossible d'expliquer comment la cellule musculaire répond à des charges de travail qui dépassent de 10 à 20 fois le niveau du repos ou expliquer l'augmentation de la consommation de l'oxygène en présence d'une concentration stable en ADP (calculée à partir de la réaction de la CK à l'équilibre). Pour surmonter cette situation la théorie de régulation du métabolisme énergétique par l'ADP et la créatine kinase a été remplacée par l'hypothèse de l'activation parallèle par les ions de calcium.

1.3. L'hypothèse de l'activation parallèle de l'hydrolyse de l'ATP et de la phosphorylation oxydative par le Ca^{2+} .

Cette hypothèse a été reprise par Korzeniewski 1998, Balaban 2002. En conformité avec cette hypothèse le Ca^{2+} initie la contraction musculaire et par conséquent l'hydrolyse de l'ATP. Parallèlement, les ions de calcium entrent dans la matrice mitochondriale où ils activent les déshydrogénases du cycle de Krebs en induisant la production du NADH et FADH_2 (Figure 28). L'oxydation des derniers génère la force proton-motrice accompagnée de l'augmentation du flux des électrons à travers la chaîne respiratoire et la régénération de l'ATP. Le Ca^{2+} active directement la F_1F_0 -ATPsynthase et, probablement le complexe I (Balaban 2002, Baniene et al. 2006, Brandes et Bers 2002, Brookes et al. 2004, Grueter et al. 2006, Territo et al. 2001a).

L'hypothèse de l'activation par le calcium n'a cependant pas trouvé de confirmation unanime. Il a été montré expérimentalement et mathématiquement que le Ca^{2+} ne peut pas induire une augmentation de la respiration mitochondriale plus de deux fois par rapport au Stade 4 de la respiration, ces résultats étant en conformité avec ceux trouvés par Chance (Territo et al. 2001b). Tandis que l'augmentation du travail cardiaque par remplissage du ventricule gauche (loi de Frank-Starling) peut induire une

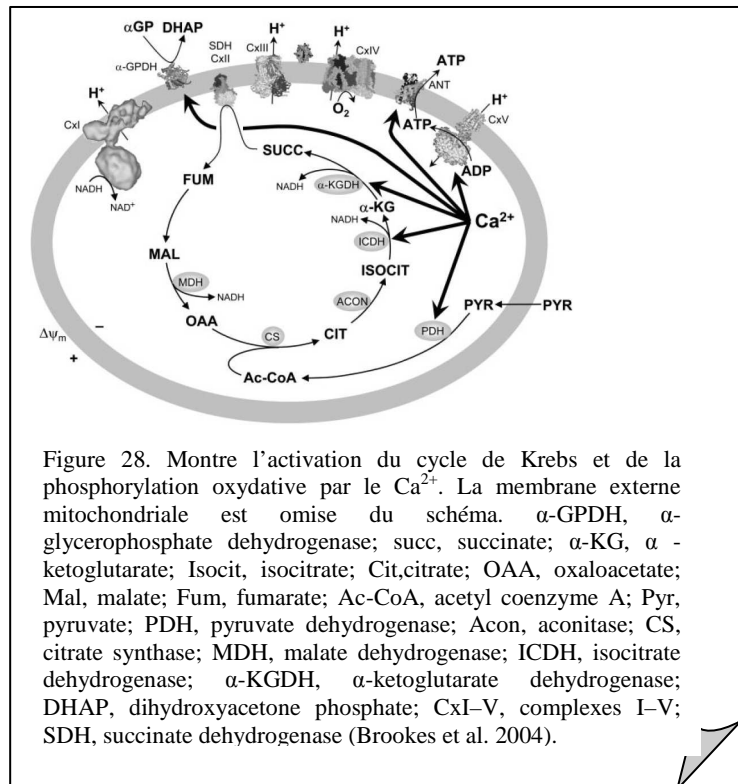


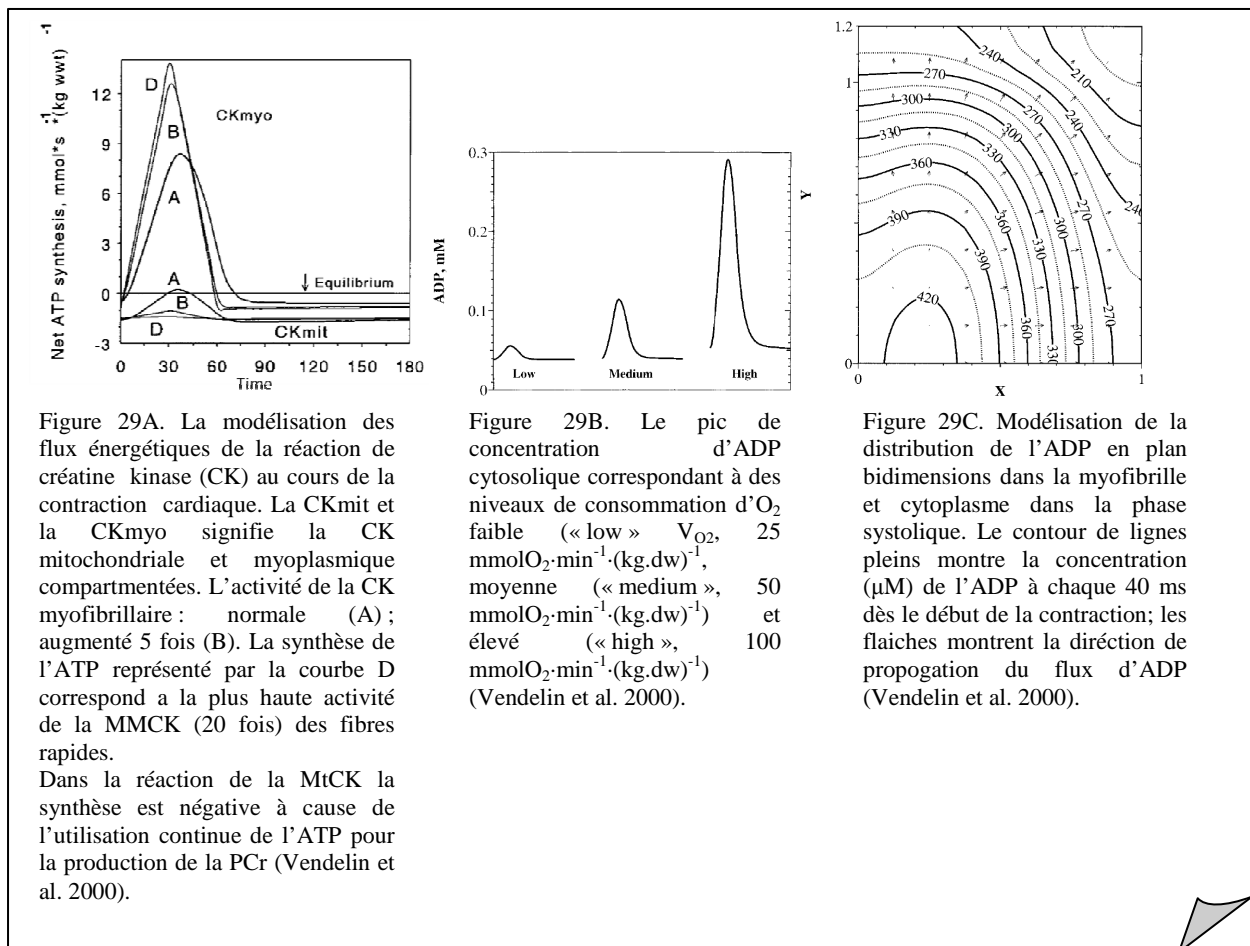
Figure 28. Montre l'activation du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative par le Ca^{2+} . La membrane externe mitochondriale est omise du schéma. α -GPDH, α -glycerophosphate dehydrogenase; succ, succinate; α -KG, α -ketoglutarate; Isocit, isocitrate; Cit, citrate; OAA, oxaloacetate; Mal, malate; Fum, fumarate; Ac-CoA, acetyl coenzyme A; Pyr, pyruvate; PDH, pyruvate dehydrogenase; Acon, aconitase; CS, citrate synthase; MDH, malate dehydrogenase; ICDH, isocitrate dehydrogenase; α -KGDH, α -ketoglutarate dehydrogenase; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; CxI-V, complexes I-V; SDH, succinate dehydrogenase (Brookes et al. 2004).

augmentation de la respiration d'un facteur 10 (Williamson et al. 1976), le flux transitoire du Ca^{2+} reste stable au cours la phase d'activation longueur-dépendante (ou d'espacement en treille des filaments) des sarcomères (Kobayashi et Solaro 2005). Plusieurs auteurs ont montré que le flux transitoire de Ca^{2+} reste stable au cours des contractions cardiaques à fréquence stable (Mizuno et al. 2001, Shimizu et al. 2002). La régulation par les ions Ca^{2+} seront reliée à la modification de l'activation de la phosphorylation oxydative plutôt qu'à son rétrocontrôle au cours de la contraction cardiaque (Balaban 2002, Bianchi et al. 2004, Brookes et al. 2004, Gunter et al. 2004, Jouaville et al. 1999, McCormack et al. 1990, Territo et al. 2001b). En effet, Korzeniewski, dix ans plus tard 2008, a mentionné que le mécanisme de l'activation parallèle par le Ca^{2+} est caractéristique de la stimulation physiologique par l'adrénaline (Bers 2002, Brini 2003, Korzeniewski et al. 2008). La stimulation du travail cardiaque induite par l'augmentation des catécholamines peut augmenter de 3 à 5 fois la demande en ATP (Katz et al. 1989).

1.4. La théorie du transfert de l'énergie compartimentée

La théorie de l'équilibre de la réaction de la CK ne prend pas en compte l'existence de la compartimentation du système de transfert de l'énergie dans la cellule (la compartimentation des différentes isoformes de la CK couplées aux ATPases et des

métabolites adényliques). Afin de montrer l'importance de la compartimentation, la concentration des métabolites adényliques en fonction de l'activité enzymatique des isoenzymes compartimentées de la CK (myofibrillaires et mitochondriales) a été calculé (Aliev et Saks 1997, Vendelin et al. 2000, modèle mathématique utilisé : VAS – Vendelin, Aliev, Saks) (Figure 29A). La représentation graphique de l'estimation de la synthèse de l'ATP dans la réaction MMCK en fonction du travail, montre que la production = 0 de l'ATP,



correspondant à l'état de l'équilibre de la réaction de la MMCK, n'est jamais atteinte sauf dans la phase diastolique quand l'utilisation de l'ATP est minimale. La réaction MtCK n'est jamais à l'équilibre à cause du couplage avec la phosphorylation oxydative. L'acceptation du non-équilibre de la réaction de la CK a permis de comprendre le mécanisme de régulation de la phosphorylation oxydative par l'ADP.

Le modèle mathématique VAS, en reproduisant les conditions de stabilité métabolique, révèle des variations importantes de la concentration d'ADP dans l'espace péri-myofibrillaire (Saks et al. 2006b, Vendelin et al. 2000). En conformité avec ce modèle, l'amplitude de l'ADP, produit par les ATPases myofibrillaires, est directement proportionnelle à la charge de travail (Figure 29B) (Vendelin et al. 2000). En calculant la

concentration en ADP en fonction de plusieurs paramètres, comme la capacité d'utilisation de l'ADP par la MMCK, le modèle révèle l'existence du gradient de concentration de l'ADP entre le centre de la myofibrille et la mitochondrie (Figure 29C). De plus, la propagation de l'information des impulsions d'ADP se réalise par le mécanisme d'acheminement dirigé du ligand (*vectorial ligand conduction*) en respectant la diminution du gradient de concentration de l'ADP du centre des myofibrilles vers la mitochondrie (Dzeja et Terzic 2005). L'apparition de ce gradient a été expliquée par la restriction à la diffusion des nucléotides adenyliques dans la cellule (du à l'inhomogénéité du milieu intracellulaire) et par l'état de non-équilibre de la réaction de la CK (Vendelin et al. 2000).

L'augmentation de la production de l'ADP, induite par l'augmentation de la charge de travail, se traduit par une stimulation de la phosphorylation oxydative (Aliev et Saks 1997). L'augmentation de la synthèse de l'ATP mitochondriale provoque l'augmentation de la production de PCr par la MtCK grâce à son couplage fonctionnel avec l'ANT (ou du synthasome Pedersen 2007b) avec la MtCK. De ce fait, les oscillations de l'ADP participent au signal métabolique qui relie la contraction à la régénération de l'ATP. Le signal ADP peut être synchronisé avec les variations de la concentration du Ca^{2+} dans le cytoplasme et la mitochondrie, qui influencent l'activité des enzymes du cycle citrique (Harrisson et al. 1999).

2. Le rôle de la membrane externe mitochondriale comme barrière de diffusion sélective dans la régulation de la respiration - le rôle du cytosquelette

Dans les années 1990-2000, années du développement et de l'introduction de la technique de fibres perméabilisées dans l'étude bioénergétique, il y a été observé que la régulation de la respiration mitochondriale est dépendent de l'organisation cellulaire (Saks et al. 1998a). Les études cinétiques ont montré que le K_m apparent pour l'ADP dans les fibres musculaires cardiaques perméabilisées est 20 fois plus élevé par rapport aux mitochondries isolées ($K_m^{app}ADP$ 10 μM pour les mitochondries isolées et 250-300 μM pour les fibres perméabilisées) (Dos Santos P et al. 2002, Fontaine et al. 1995, Kay et al. 1997, Kuznetsov et al. 1996, Saks et al. 1998a, Saks et al. 1991, Saks et al. 1994, Saks et al. 2001, Seppet et al. 2001). En conformité avec Klingenberg 1970, le $K_m^{app}ADP$ égal à 10 μM caractéristique pour les mitochondries isolées, correspond à l'affinité apparente de l'ANT pour l'ADP (Klingenberg 1970). L'absence du changement du K_m^{app} pour l'ADP libre dans les fibres dépourvues de myosine, a montré que ce paramètre n'est pas influencé ni par la distance, ni par le gradient de diffusion de l'ADP dans la cellule (Kay et al. 1997). Par contre, la

désorganisation du cytosquelette des cardiomyocyte par la trypsine induit la diminution du K_m apparent pour l'ADP libre, c'est-à-dire l'augmentation de l'affinité de l'ANT pour l'ADP libre (Kuznetsov et al. 1996). L'équipe de Zoll a montré que le K_m apparent pour l'ADP libre des fibres musculaires squelettiques perméabilisées augmente 2-3 fois suite à l'entraînement en endurance des animaux de laboratoires (Zoll et al. 2002). Des résultats comparables avec le doublement du K_m apparent pour l'ADP libre suite à l'entraînement ont été décrits chez les transplantés pulmonaires (Guerrero et al. 2005). Aussi, le métabolisme énergétique de la cellule cardiaque a été modélisé montrant que la différence de l'affinité de la respiration mitochondriale pour l'ADP est due au phénomène de la restriction de la diffusion et de la compartimentation des métabolites adényliques dans la cellule (Vendelin et al. 2000). Les interactions structurales et fonctionnelles de la mitochondrie *in situ*, intégrée dans l'environnement cellulaire, influencent ces propriétés en leur attribuant des nouvelles caractéristiques – donc, ce sont des propriétés dépendantes du niveau d'organisation des systèmes ou « system level properties ». Il a été supposé qu'un facteur protéique, nommé le facteur « x », qui pouvait être représenté par une ou plusieurs protéines du cytosquelette, pourrait influencer les propriétés de barrières pour les métabolites adényliques au niveau de la membrane externe mitochondriale (Appaix et al. 2003). La participation de plusieurs protéines à la fixation et à la modification des propriétés de la MOM a été testée ces dernières années sans résultats convaincants. Plusieurs protéines ont été testées pour leur rôle possible dans la régulation de la respiration mitochondriale comme la plectine, la desmine et la tubuline (Appaix et al. 2003). Actuellement, l'intérêt scientifique est tourné vers le rôle de la tubuline dans la perméabilité de la MOM. Il a été montré que la tubuline dimérique en concentrations nanomolaires provoque la fermeture réversible de la porine (VDAC) reconstituée dans une membrane planaire phospholipidique (Rostovtseva et Bezrukov 2008, Rostovtseva et al. 2008). Les expérimentations menées dans notre laboratoire par Claire Monge ont montré que le K_m apparent pour l'ADP libre augmente en présence de la tubuline dimérique rajoutée aux mitochondries isolées (le $K_m^{\text{app}}\text{ADP}$ pour les mitochondries isolées est de 10 μM et en présence de la tubuline de 170 μM) (Rostovtseva et Bezrukov 2008, Rostovtseva et al. 2008).

3. La régulation du métabolisme énergétique dans les cardiomyocytes

L'utilisation des substrats énergétiques (glucose/glycogène, acides gras) est soumise au rétrocontrôle métabolique réalisé par le travail (*décrit dans nos revues 2 et 3*). Leur choix dépend du type de muscle et de la fonction qu'il exerce. En présence des glucides et des acides gras, 60-90 % de l'oxygène consommé par le cœur est utilisé pour oxyder les acides gras (Neely et Morgan 1974). Les mécanismes responsables pour le choix préférentiel des AG par rapport au glucose par la cellule cardiaque sont:

- l'inhibition concurrentielle du transport du glucose par les AG (Neely et Morgan 1974, Roden 2004). En condition d'un travail peu intense, l'acétyl-CoA mitochondriale et la NADH produit par la β -oxydation inhibent le complexe du pyruvate déshydrogénase dans la membrane interne mitochondriale. Le citrate produit en excès dans le cycle Krebs, étant transporté dans le cytoplasme, inhibe la phospho-fructo-kinase (PFK), en induisant l'accumulation de la glucose-6-phosphate (G6P), qui inhibe l'hexokinase (HK) et diminuer le transport du glucose (Neely et Morgan 1974, Passonneau et Lowry 1964, Randle 1998, Stanley et al. 2005, Williamson 1979, Williamson et al. 1976).
- La NADH issue des réactions du cycle Krebs et de la β -oxydation des acides gras est plus rapidement disponible pour la NADH déshydrogénase que celle importée via la navette *malate-aspartate* et *glycérophosphate* en provenance de la glycolyse (Kobayashi et Neely 1979, Williamson 1979). Un autre mécanisme pas moins important est l'entrée directe du NADH de la β -oxydation des acides gras directement dans la chaîne respiratoire via le electron-ransferring flavoprotein (ETF)-ubiquinon oxidoreductase.
- La glycolyse nécessite la forme oxydée de NAD^+ qui en conditions anaérobie est produite dans la réaction de réduction du pyruvate en lactate catalysée par LDH, ou par les deux navettes mitochondriales. Comme résultat, la glycolyse s'accompagne de l'accumulation du lactate et des H^+ qui ralentissent et reversent la réaction catalysée par le LDH.

Dans les cellules vivantes la disponibilité des substrats n'est pas suffisant pour la stimulation d'une réaction enzymatique ni de sa direction. Par exemple, un excès de glucose n'active pas la réaction catalysée par la hexokinase (la première étape de la glycolyse). L'activité de cette enzyme est régulée par des multiples effecteurs allostériques, de sorte que

la production de l'ATP et du pyruvate soit ajustée aux besoins de la cellule (Lodish H et al. 1995).

La réaction d'hydrolyse de l'ATP par les ATPases myofibrillaires induit l'augmentation locale de la concentration en ADP. **Ce signal est transmis à l'ANT via la navette CK/PCr** (Saks et al. 2006a, Vendelin et al. 2000). Le Pi, issue de la réaction d'hydrolyse (Wallimann et al. 1992) de l'ATP, entre dans la mitochondrie via un transporteur spécial, PIC (Bose et al. 2003, Saks et al. 2006a). Les deux signaux activent l'ATP synthase et par la suite l'utilisation du gradient électrochimique transmembranaire de protons ($\Delta\mu\text{H}^+$) (Hassinen et Hiltunen 1975, Nicholls et Ferguson 2002, Williamson 1979). La diminution du rapport NADH/NAD^+ (Figure 30B) qui accompagne l'augmentation du flux des électrons vers l'oxygène, induit une activation des réactions de déshydrogénases dans le cycle Krebs en les adaptant au rapport de transfert des électrons (Neely et Morgan 1974, Williamson 1979). En résultat le niveau d'acétyl-CoA dans la matrice chute en activant à son tour la β -oxydation des AG et le transport de l'acyl-carnitine dans la mitochondrie (Neely et Morgan 1974). Donc, le mécanisme de fonctionnement correspond plutôt à l'hypothèse de « pull » décrite par des modèles mathématiques (Cortassa et al. 2003, Vendelin et al. 2000). Dans les conditions d'utilisation intense de l'acétyl-CoA (Figure 30A), expérimentalement prouvé par Neely (Neely et al. 1972, Neely et al. 1973), celui-ci ne peut pas sortir dans le cytoplasme. Neely et al., ont montré la diminution de l'acétyl-CoA en fonction du travail du cœur isolé et perfusé en présence du phénomène de la stabilité métabolique (stabilité du niveau de l'ATP, de la PCr, de la Cr et de l'AMP au cours du travail). En absence de son substrat l' $\text{ACC}\beta$ disparaît et le malonyl-CoA est décarboxylé en acétyl-CoA par le malonyl-CoA decarboxylase (MAD).

En cas de diminution de la charge de travail, le mécanisme s'inverse. L'acétyl-CoA non utilisé dans le cycle Krebs sort dans le cytoplasme via le transporteur de l'acétyl carnitine (CAC) (Marquis et Fritz 1965, Neely et Morgan 1974, Reszko et al. 2004, Roden 2004, Schonekess et Lopaschuk 1995) où il est carboxylé en malonyl-CoA par $\text{ACC}\beta$. Le malonyl-CoA inhibe le transporteur de carnitine palmytoil (CPTI) est respectivement l'utilisation des acides gras pour la synthèse de l'ATP. Ce mécanisme protège la chaîne respiratoire de l'effet découplant de l'excès des intermédiaires de l'oxydation des acides gras (Dyck et Lopaschuk 2002, Neely et Morgan 1974, Taegtmeyer et al. 2005). L'utilisation des substrats énergétiques dans les muscles squelettiques dépend de l'intensité du travail : les glucides sont brûlés pour réaliser un travail de haute intensité et de courte durée, alors que les lipides sont brûlés pour un travail de longue durée mais d'intensité faible, sous-maximale (d'environ 65% de la puissance maximale). Les mécanismes de régulation du métabolisme

dans le muscle squelettique différent de ceux du muscle cardiaque (Jorgensen et al. 2006, Kushmerick et al. 1992). Dans le muscle squelettique le phénomène de stabilité métabolique n'existe pas, le niveau de la PCr et le rapport de l'ATP/AMP diminue en augmentant par conséquent l'activité de l'AMP kinase (AMPK). L'AMPK, en phosphorylant et, par conséquent, en désactivant l'acétyl-CoA carboxylase- β (ACC β), diminue le contenu en malonyl-CoA. En résultat le CPTI n'est pas inhibé et le transport de l'acyl-CoA est libre (Merrill et al. 1997, Park et al. 2002, Winder et Hardie 1996).

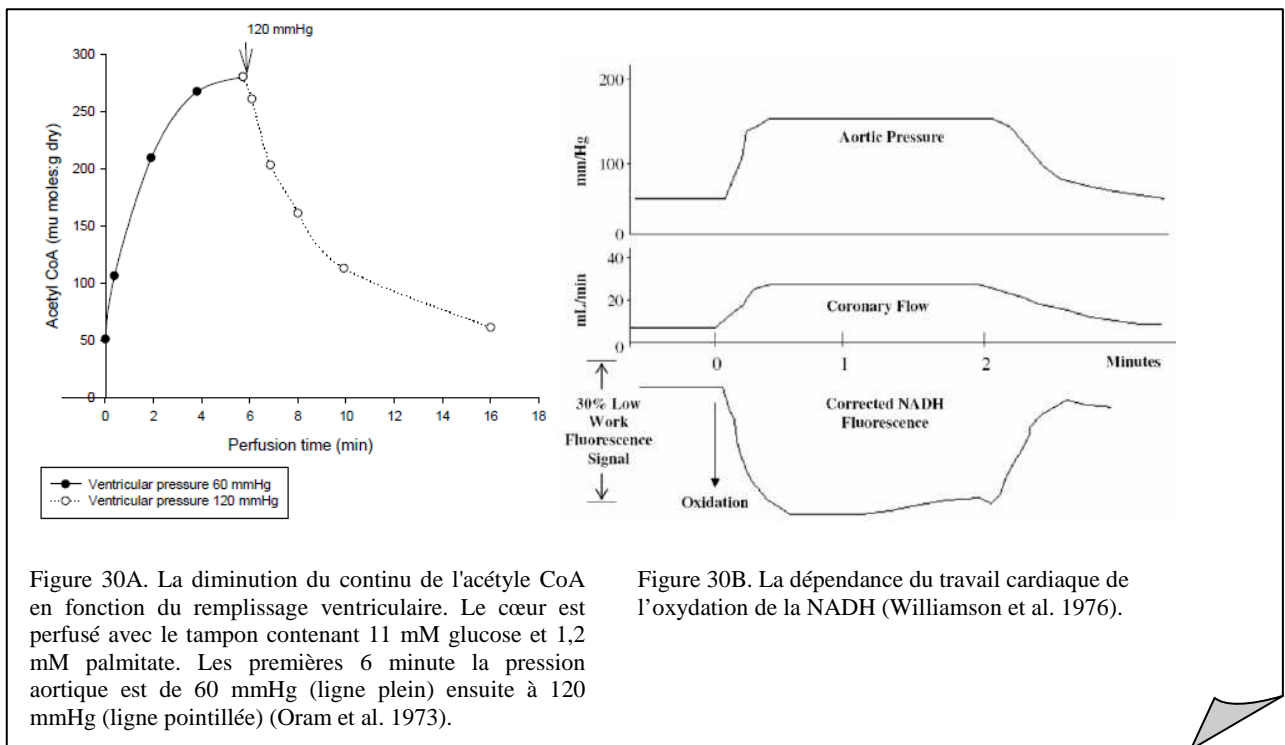


Figure 30A. La diminution du contenu de l'acétyl CoA en fonction du remplissage ventriculaire. Le cœur est perfusé avec le tampon contenant 11 mM glucose et 1,2 mM palmitate. Les premières 6 minutes la pression aortique est de 60 mmHg (ligne plein) ensuite à 120 mmHg (ligne pointillée) (Oram et al. 1973).

Figure 30B. La dépendance du travail cardiaque de l'oxydation de la NADH (Williamson et al. 1976).

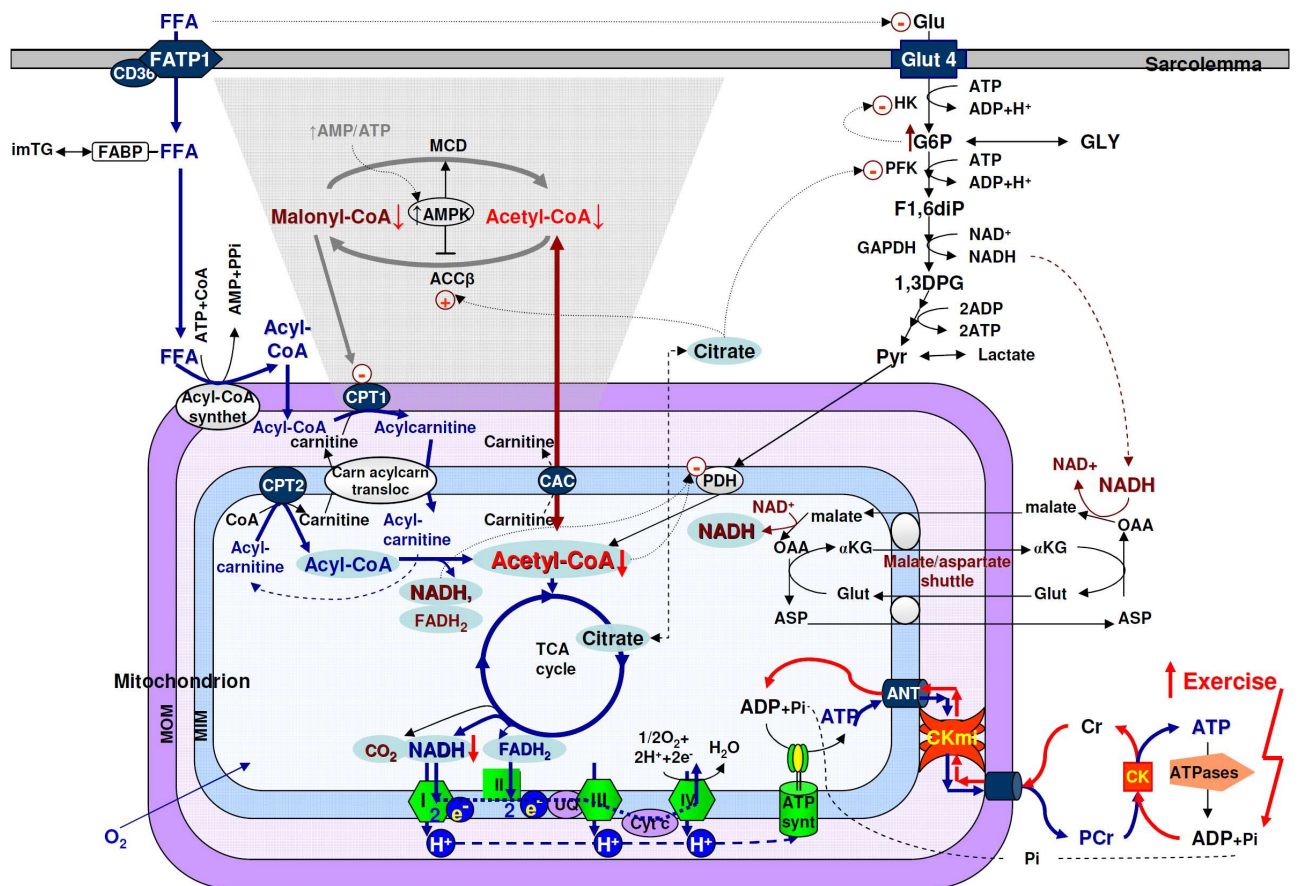


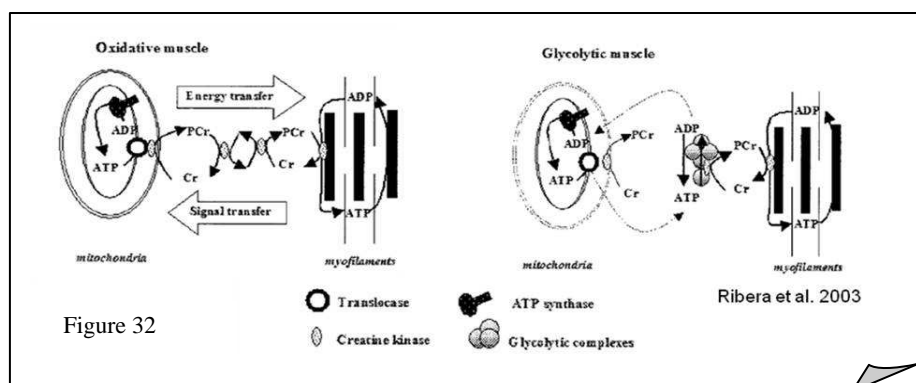
Figure 31. Le glucose (GLU) entre dans la cellule via le transporteur (GLUT-4) où il est converti par les enzymes glycolytiques en 2 molécules de pyruvate (PYR) parallèlement à la production de 4 ATP et 2 NADH. G6P – glucose 6-phosphate, HK – hexokinase, PFK – phosphofructokinase; GLY – glycogène; F1,6diP – fructose-1,6-diphosphate, GAPDH – glyceraldehydephosphate deshydrogenase, 1,3DPG – 1,3 diphosphoglycerate. Le potentiel de réduction du NADH est transféré dans la matrice mitochondriale via la navette malate/aspartate; OAA – oxaloacetate, Glut – glutamate, α KG – alpha – ketoglutarate, ASP – aspartate. Le malate entre dans la matrice en échange de l'alpha-ketoglutarate (α KG) où il produit le NADH. L'oxaloacetate (OAA) matriciel retourne dans le cytosol après sa conversion en ASP et l'échange avec le glutamate (Glut). La plupart de l'énergie métabolique extraite du glucose provient de l'entrée du pyruvate dans le cycle de l'acide citrique et la phosphorylation oxydative via la production de l'acetyl-CoA. La NADH et la FADH₂ sont oxydés dans la chaîne respiratoire (complexes I, II, III et IV). En conditions anaérobie le pyruvate est oxydé en lactate.

La régulation par rétrocontrôle. Si le glucose et les acides gras sont disponibles en même temps, les AG inhibent le transport de glucose à travers la membrane cellulaire, l'oxydation de l'acetyl-CoA augmente le rapport mitochondrial acetyl-CoA/CoA et NADH/NAD⁺, qui inhibe le complexe pyruvate déshydrogénase (PDH), l'augmentation du contenu du citrate (produit dans le cycle des acides citriques) peut inhiber la phosphofructokinase (PFK). Ce changement freine l'oxydation du glucose et du pyruvate (PYR) et augmente le contenu du glucose-6-phosphate (G6P), qui inhibe l'hexokinase (HK), et diminue le transport du glucose. La créatine kinase mitochondriale (miCK) catalyse la transphosphorylation directe de ATP mitochondrial et de la créatine (Cr) intermembranaire en ADP et en phosphocréatine (PCr). L'ADP entre dans la matrice pour stimuler la phosphorylation oxydative. La PCr est transférée via la navette cytosolique Cr/PCr vers la CK couplée aux ATPases (myosine ATPases), résultant en l'hydrolyse de l'ATP. Quand la charge de travail augmente, la synthèse de l'ATP et la respiration augmente grâce au signal de rétrocontrôle via le système de la CK, résultant en diminution du contenu de l'acetyl-CoA mitochondrial, qui est transféré dans le cytoplasme via le transporteur carnitine acetyl (carnitine acetyl carrier, CAC). Acetyl-CoA carboxylase (ACC) est responsable de la conversion de l'acetyl-CoA en Malonyl-CoA, inhibiteur du CPT-I, pour éviter la surcharge de la mitochondrie avec des intermédiaires de l'oxydation des AG, quand la charge de travail diminue. L'inactivation de l'ACC via la phosphorylation par l'AMP protein kinase (AMPK) induit la diminution de la concentration du malonyl-CoA. La diminution du niveau de malonyl CoA desinhibe le CPT1, résultant en une augmentation de l'oxydation des AG. Le Malonyl-CoA est converti de nouveau en acetyl-CoA par le malonyl-CoA decarboxylase (MCD). L'augmentation de la charge de travail augmente la consommation de l'acetyl-CoA en diminuant le contenu du malonyl-CoA (Saks et al. 2006a).

4. Aspects spécifiques du métabolisme énergétique du muscle squelettique

A la fin de 19emem siècle avant la découverte de l'ATP et de l'oxydation phosphorylante (1929-1930), Chauveau et Kaufmann (Chauveau et Kaufmann 1887) ont lancé l'hypothèse selon laquelle le substrat énergétique dominant pour la contraction du muscle squelettique au cours de l'exercice était le glucose. Le rôle des lipides ils ont limité à la conversion en glucose et en glycogène dans le foie. En 1920, Krogh et Lindhardt (Krogh et Lindhardt 1920) en proposant de mesurer le quotient respiratoire ($QR = VCO_2 / VO_2$) au cours de l'exercice ont montré que le substrat énergétique préférentiel pour un exercice de longue durée (2 heures) sont les lipides. Aujourd'hui il est bien connu que le choix du substrat énergétique, la synthèse et l'intensité de utilisation de l'ATP, les mécanismes de la régulation du métabolisme énergétique sont dépendants de type de fibre. Schiaffino a décrit 3 isoformes de chaîne lourde de myosine (MyHC) constituant le muscle squelettique de l'Homme : type I, IIa, IIx (IIb dans le muscle squelettique du rats) (Pereira Sant'ana et al. 1997, Schiaffino et Reggiani 1996). Les fibres de type I sont lent, oxydative, résistantes à la fatigue car dépendantes du métabolisme oxydatif. Les fibres de type IIx sont des fibres rapides glycolytiques, fatigables car la conversion d'énergie est basée sur le métabolisme glycolytique (Armstrong 1988, Harridge et al. 1996, Mccomas 1996). Les fibres de type IIa possèdent une capacité oxydative et une résistance à la fatigue intermédiaires entre les fibres de type I et de IIx.

Les fibres de muscles lents oxydatifs sont adaptées pour soutenir un travail prolongé (Kay et al. 2000, Saks et al. 2001, Ventura-Clapier et al. 1998). Elles contiennent 6-10 % de mitochondries par rapport au volume de fibres et utilisent en grande partie des acides gras comme substrat énergétique. L'ATP mitochondriale est transphosphorylé par la MtCK en PCr qui est transférée via la navette CK/PCr vers les sites d'utilisation de l'ATP. Le rétrocontrôle métabolique est réalisé par la créatine (Figure 32). Le muscle rapide glycolytique est adapté à une brève et intense utilisation de l'énergie basée sur la disponibilité immédiate du stock cytosolique de la PCr et sur une activité



glycolytique élevée (Kuznetsov et al. 1996, Veksler et al. 1995). Le contenu en mitochondries du muscle glycolytique est d'environ d'un pourcent par rapport au volume des fibres. C'est pour cela que ce type de muscle n'est pas capable de métaboliser intensivement les acides gras. Les fibres glycolytiques ont un contenu important en PCr et une affinité élevée de la mitochondrie pour l'ADP libre, ce qui joue un rôle dans le signal métabolique pour la respiration mitochondriale. Une partie de la MM-CK cytosolique est couplée aux complexes glycolytiques et assure ainsi le transfert des groupements P_i vers les ATPases. Dans ce type de fibre, la MtCK est mal couplée à la respiration mitochondriale et ne sert qu'à compléter les stocks cellulaires de la PCr.

Ainsi, les mécanismes de régulation des flux d'énergie dans les cellules font parti des propriétés étudiées au niveau des systèmes, qui ne sont pas prédictibles à partir des propriétés des composants isolés mais dépendent des interactions intracellulaires. Ces mécanismes complexes de régulation de l'énergétique cellulaire (compartimentation métabolique et mécanismes de régulation de la respiration) peuvent être donc expliqués par des approches de la Bioénergétique Systémique Moléculaire.

Notre but sera d'étudier la régulation de la respiration mitochondriale des cellules perméabilisée en appliquant la théorie de rétrocontrôle afin de comprendre les mécanismes intracellulaires de l'homéostasie métabolique.

PROBLEMATIQUE

Dans cette étude, **la théorie actuelle de régulation de la respiration mitochondriale par un mécanisme de rétrocontrôle métabolique et par un transfert de l'énergie** (via les réactions hors d'équilibre des isoformes compartimentés de la CK) est basée sur de multiples études expérimentales, concernant les propriétés cinétiques de la CK *in vitro* des mitochondries isolées, la cinétique de régulation de la respiration des cellules et des fibres perméabilisées, la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire *in vivo* et la modélisation mathématique.

Selon cette théorie, la MtCK est considérée comme étant le facteur principal de régulation de la respiration mitochondriale dans les cellules de haute demande en énergie comme dans les cellules cardiaques. Cependant, à ce jour, les données expérimentales sur les propriétés fonctionnelles et cinétiques de la MtCK *in situ*, dans les cellules vivantes, manquent à cause de la complexité de ce système. Dans les conditions *in vivo*, la phosphorylation oxydative est influencée par d'autres systèmes utilisant l'ADP, comme par exemple, la glycolyse, et les mitochondries sont contrôlées par des protéines du cytosquelette grâce aux interactions structurales.

C'est pourquoi, le but de notre travail a été d'étudier les mécanismes de régulation de la respiration mitochondriale, contrôlée par la créatine kinase mitochondriale, et des flux d'énergie dans les cellules musculaires.

Pour cela, nous avons étudié la cinétique de régulation de la respiration mitochondriale contrôlée par la MtCK *in situ* dans les cardiomyocytes perméabilisés. Afin de mimer les effets de la glycolyse dans les cardiomyocytes perméabilisés, i.e. l'utilisation de l'ADP et la régénération de l'ATP endogène extra-mitochondrial, nous avons utilisé le système piège pour l'ADP libre constitué du phosphoénolpyruvate et de la pyruvate kinase, qui permet d'étudier la cinétique de la réaction de la MtCK *in situ*. Ce protocole a également été utilisé pour l'étude de l'effet toxique de la doxorubicine (adriamycine) sur les cellules cardiaques musculaires de rat.

De plus, les méthodes d'investigations de la régulation de la respiration mitochondriale dans les muscles, validées chez le Rat, ont été utilisées pour l'étude de la bioénergétique des cellules musculaires squelettiques chez l'Homme (malades atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive).

MATERIEL ET METHODES

I. Préparation du matériel biologique

1. Animaux

Les expérimentations animales ont été effectuées en conformité avec le « Guide for the Care and Use of Laboratory Animals » publié par le National Institute of Health (NIH Publication, No 85-23, révisé en 1985). Les rats Wistar mâles d'environ 300 g ont été utilisés pour la préparation des fibres musculaires (ventricule gauche, muscle soléaire et muscle gastrocnémien), l'isolement des cardiomyocytes et des mitochondries du muscle cardiaque

2. Préparation des fibres musculaires de rat

Les fibres issues de trois types de muscles ont été isolées : le ventricule gauche, le muscle soléaire (oxydatif) et le muscle gastrocnémien blanc (glycolytique). La technique appliquée a été récemment décrite dans Nature par Kuznetsov (Kuznetsov et al. 2008) et antérieurement par Saks (Saks et al. 1998b). Les rats Wistar sont anesthésiés au pentobarbital sodique (50 mg/kg du poids corporel), le cœur ou les muscles prélevés sont transférés dans la solution de conservation à 4°C (cf. §III). Le cœur est ouvert le long du ventricule gauche et des fines bandelettes de muscle cardiaque sont prélevées. Le muscle soléaire entier (totalement oxydatif) et le muscle gastrocnémien blanc (partie glycolytique) sont utilisés pour la dilacération. Les fibres sont séparées les unes des autres en les écartant, avec des pinces courbes fines, non aimantées et aux extrémités fines, dans la solution de conservation (cf. §III), à 4°C. Ensuite, les fibres sont perméabilisées par la saponine et lavées dans la solution Mitomed (cf. §III). Avant d'être utilisées, les fibres sont gardées à 4°C dans la solution Mitomed. A la fin des tests, chaque bout de fibres (environ 5 mg poids frais) est séché dans des feuilles d'aluminium à 100°C pendant 48h afin de déterminer le poids sec.

3. L'isolement des cardiomyocyte adultes de rat

Le système de perfusion de Langendorf est utilisé comme procédure d'isolement classique avec des petites adaptations. Les rats sont anesthésiés en conformité avec la procédure décrite précédemment et un anticoagulant est injecté (500 U of héparine) dans la

veine fémorale. Le cœur excisé est transféré dans la solution d'isolement (température ambiante, pH 7,1) et canulé par l'aorte ascendante. Le cœur est perfusé pendant 5 min avec la solution d'isolement (cf. §III) (débit 15-20 mL/min, à 37°C) afin d'éliminer le sang. Ensuite, puis avec 1 mg/ml de collagénase A (20-30 min). Le cœur est ensuite transféré dans une solution contenant 20 µM de CaCl₂, 10 µM de leupeptine, 2 µM d'inhibiteur de trypsine (STI) et 2 mg/ml BSA pour stopper la digestion enzymatique. Le cœur est émincé et l'homogénat filtré. Puis, la sédimentation et le lavage des cellules se déroulent 3-4 fois à la température ambiante dans la même solution. Ensuite le culot cellulaire est transféré progressivement dans la solution Mitomed sans calcium, contenant 10 µM leupeptin, 2 µM STI et 5 mg/ml BSA et lavé 5 fois. Le culot final contenant 70-90% de cardiomyocytes en bâtonnet est gardé pas plus de 3 heures à 4°C pour des les expériences.

4. Isolement des mitochondries de cœur de rat

Les mitochondries cardiaques ont été isolées à partir des cœurs des trois rats Wistar d'environ 300 g chacun, en conformité avec la technique décrite par Saks (Saks et al. 1975). Les rats ont été anesthésiés avec du pentobarbital (50 mg/kg du poids corporel). Les cœurs excisés sont transférés dans la solution de sucrose (cf. §III) à 4°C. Les ventricules sont émincés et homogénéisés à l'aide d'un potter en verre (clearance 0,7-0,8) à 200 rpm, à 4°C pendant 30 sec. Ensuite la digestion du tissu conjonctif est réalisée en utilisant 0,125 mg/mL trypsine pendant 15 min à 4°C. L'action de l'enzyme est stoppée par 0.5 mg/mL d'inhibiteur de trypsine (soybean trypsin inhibitor, STI) et deux homogénéisations sont réalisées en utilisant des potters de clearance décroissant à 250-300 rpm, à 4°C suivies par la centrifugation de l'homogénat à 6300 g pendant 10 min à 4°C. Le culot obtenu est ressuspendu et recentrifugé trois fois dans la solution de sucrose supplémentée avec 1 mg/ml de BSA (fatty acid free bovine serum albumin) à 3800g, pour 10 min chaque fois, à 4°C. Le culot final est ressuspendu dans 1 ml de solution de sucrose et gardé à 4°C pendant le temps des expériences (pas plus de 3 heures).

5. Culture des cellules HL-1

Les cellules HL-1 NB sont cultivées dans un incubateur humidifié à 37°C dans une atmosphère de 5% CO₂ / 95% O₂. Le milieu de culture utilisé (Claycom medium, JRH Bioscines) est élaboré spécifiquement pour cette lignée. Les flacons et boîtes de culture sont

préalablement traités avec une solution contenant 0,02% de gélatine et 12,5 mg/L de fibronectine. Les cellules sont détachées régulièrement à confluence, soit environ 200 000 à 300 000/cm², par incubation en présence de 0,05% trypsine et de 0,53 mM EDTA pendant 5 min à 37 °C.

II. Méthodes

1. La procédure de perméabilisation des cardiomyocytes ou des fibres musculaires

Le but de la perméabilisation est de permettre l'accès contrôlé des métabolites vers les mitochondries afin d'étudier la régulation de la respiration mitochondriale. La saponine (détergent) est utilisée comme agent de perméabilisation pour sa forte affinité pour le cholestérol contenu en grande quantité dans la sarcolème. Dans ces conditions, la membrane externe mitochondriale reste intacte car elle ne contient pas ou très peu de cholestérol. Les fibres sont perméabilisées dans la solution de conservation (cf. §III) supplémentée avec 25 µg/mL saponine pendant 30 min à 4°C et sous agitation légère. Puis trois lavages de 10 minutes dans la solution Mitomed (cf. §III) (4°C et agitation légère) permettent d'éliminer la saponine et de stopper la perméabilisation. Les cardiomyocytes sont perméabilisés directement dans la chambre d'oxygraphe dans la solution Mitomed supplémentée avec 25 µg/mL saponine, pendant 10 min à 25°C.

2. La procédure de digestion protéolytique par la trypsine.

Afin d'étudier le rôle du cytosquelette dans la respiration mitochondriale, les cellules perméabilisées sont pré-incubées avec 0,3 µM de trypsine pendant 6 min, à 25°C. La digestion est arrêtée avec 2 µM de STI (inhibiteur de trypsine) et 5 mg/ml de BSA.

3. Oxygraphie

3.1. Principe

Un oxygraphe polarographique de haute résolution (Oroboros Oxygraph-2k, Innsbruck, Austria) permet la mesure et la suivie au cours du temps de la concentration en oxygène contenue dans un milieu liquide. La partie essentielle de l'appareil est l'électrode qui est composé d'une anode d'argent et d'une cathode en or reliées par un pont de 1 mM de KCl et séparées d'une membrane de téflon perméable à l'oxygène. Le courant électrique produit est proportionnel à la concentration en oxygène dissous. La variation de concentration en oxygène dans la solution produit une variation d'intensité du courant mesurable à l'aide d'un enregistreur. Chaque jour d'expérience, l'électrode est calibrée (concentration de 0 et de 100 % d'oxygène). Toutes les mesures oxygraphiques sont réalisées à 25°C pour les fibres musculaires et les cardiomyocytes et à 30°C pour les mitochondries, dans la solution Mitomed (cf. §III) supplémentée avec 5mM de glutamate et 2 mM de malate comme substrats respiratoire et de 2 mg/mL de BSA.

3.2. Les modèles expérimentaux

Deux modèles expérimentaux sont utilisés lors de notre étude : les mitochondries isolées (schéma I et II de la Figure 33) comme étant le modèle de référence et les cardiomyocytes perméabilisés (schéma III et IV de la Figure 33). La figure xx montre les expériences réalisées avec la stimulation de la respiration par l'ATP exogène (schémas I et II de la Figure 33) ou l'ADP endogène (schémas III et IV de la Figure 33) issue de la réaction d'hydrolyse de l'ATP exogène par les ATPases. Les schémas II et IV de la Figure 33 montrent les modèles dans lesquelles la respiration mitochondriale est stimulée par la créatine en présence de l'ATP (c'est-à-dire, en présence de la MtCK activée). L'ADP extramitochondrial est piégé par le système couplé formé du phosphoenolpyruvate (PEP) et de la pyruvate kinase (PK). La réaction de déphosphorylation du PEP catalysée par la PK utilise l'ADP libre et rétablit le niveau extramitochondrial de l'ATP. L'ADP endogène produit par la MtCK est transporté dans la matrice par l'acheminement direct entre la MtCK et l'ANT.

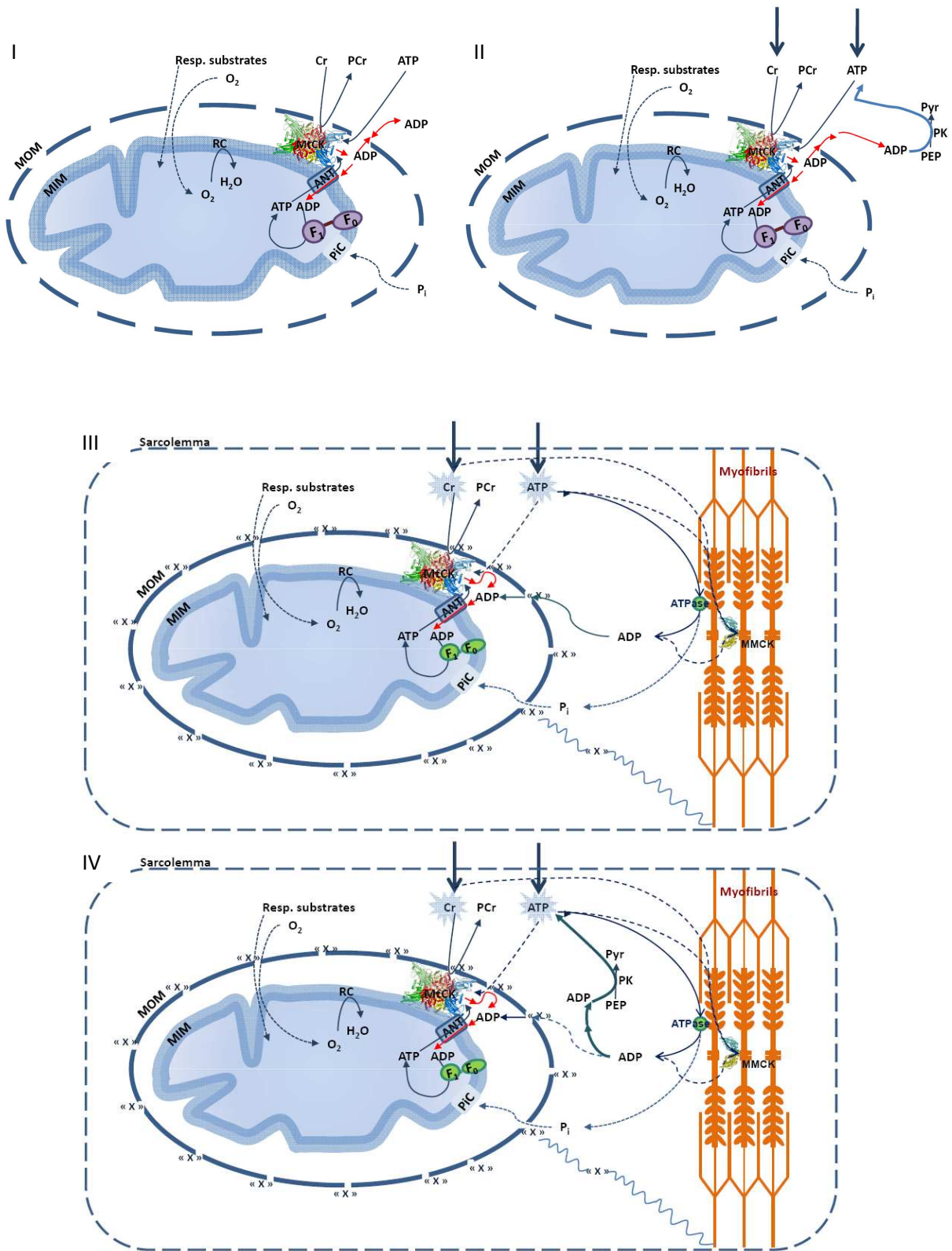


Figure 33. Modèles expérimentaux

3.3. Tests oxygraphiques

3.3.1. Test de contrôle de la respiration mitochondriale par l'accepteur d'ADP et de l'intégrité des membranes mitochondriales

Premièrement, la réaction d'oxydation du NADH par l'O₂ est couplée à la phosphorylation de l'ADP. En absence d'ADP, la vitesse de consommation d'O₂ (V₀) est très faible et n'est pas accompagnée par la synthèse de l'ATP. Cet état correspond au Stade 2 selon Chance, et la membrane interne mitochondriale est polarisée au maximum. En présence d'ADP, la vitesse de consommation d'O₂ (V_{max}) augmente, l'ADP est phosphorylé en ATP et la membrane interne mitochondriale est dépolarisée ($\Delta\Psi$ diminue). Cet état correspond au Stade 3 de la respiration. Lorsque tout l'ADP est phosphorylé, la respiration chute, c'est le Stade 4 de la respiration. Le phénomène du *contrôle par l'accepteur* (acceptor control ratio, ACR) est le contrôle de la vitesse de transport des électrons par l'ADP ($ACR = V_{max} / V_0$). Il est exprimé par le rapport entre la vitesse de respiration mitochondriale en présence et en absence de l'ADP. Cette valeur est autour de 10 pour les mitochondries intactes et diminue considérablement jusqu'au zéro en cas de découplage de l'oxydation et phosphorylation mitochondriale.

L'intégrité de la membrane externe est testée par le rajout du cytochrome c exogène en présence d'ADP. La vitesse de respiration ne doit pas changer si la membrane est intacte et dans le cas contraire, on observe une accélération de la respiration due au transport des électrons par le cytochrome c exogène. L'intégrité de la membrane interne mitochondriale est testée en ajoutant l'inhibiteur de la translocase des nucléotides adényliques (ANT) – l'atractyloside. L'atractyloside en présence d'ADP et à condition d'une membrane interne mitochondriale intacte, inhibe la respiration mitochondriale jusqu'à la V₀.

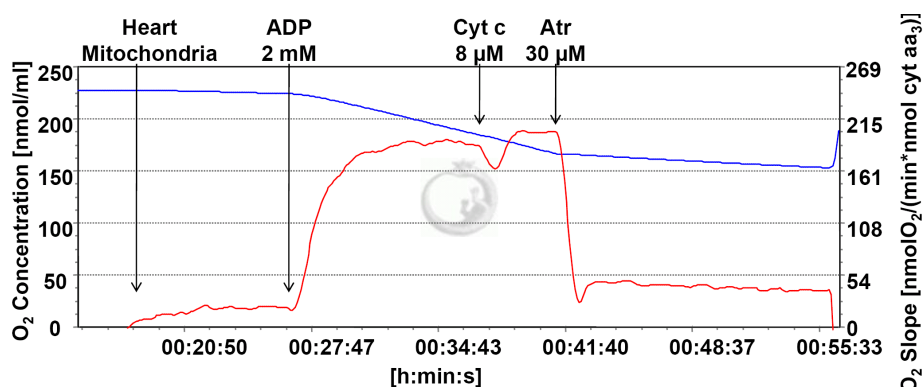


Figure 34 : Tracé oxygraphique. La courbe en bleu et l'échelle de gauche montre la consommation de l'O₂ et la courbe rouge avec l'échelle de droite montrent le flux d'O₂ (la consommation divisée par le temps).

3.3.2. Le contrôle de la respiration par l'ADP

Le but de ce test est de mesurer l'affinité apparente de l'ANT (ou de l'oxydation phosphorylante car l'ANT ne limite pas la translocation des nucléotides adényliques) pour l'ADP exogène en cas de stimulation directe par l'ADP exogène, ou pour l'ADP endogène issue des réactions des ATPases (myofibrillaires) ou des CK cellulaires à partir de l'ATP exogène. En pratique, la respiration est stimulée par des concentrations croissantes d'ADP (0,05-0,1-0,3-0,5-0,75-1,0-2,0 mM ADP) ou d'ATP (0,025-0,05-0,1-0,25-0,5-1,0-2,0 mM ATP). La cinétique de l'ADP suit l'équation de Henri, Michaelis et Menten :

$$v = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{éq.2})$$

Dans cette équation, le K_m est le paramètre apparent caractérisant l'affinité du système pour le substrat. Sa valeur est trouvée par la méthode de linéarisation (représentation en double-inverse) donnée par l'équation suivante :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (\text{éq.3})$$

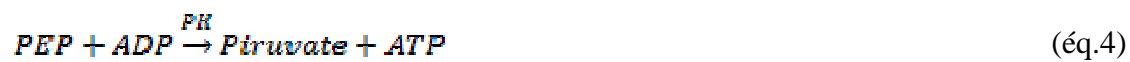
3.3.3. Le contrôle de la respiration par l'ADP en présence de la créatine

La cinétique de l'ADP ou de l'ATP exogène mesurée en présence de 20 mM de créatine change radicalement les conditions du test car la MtCK intervient comme étant un nouveau acteur du contrôle de la respiration mitochondriale. La MtCK activée grâce au couplage fonctionnel avec l'ANT reçoit, par l'acheminement direct, l'ATP mitochondriale qui transfère son groupement P_i à la créatine exogène, l'ADP ainsi formé retournant dans la matrice. De ce fait, l'oxydation phosphorylante est contrôlée par l'ADP endogène produit localement dans l'espace inter membranaire mitochondriale par la réaction de la MtCK. Ce test nous permet de mesurer l'affinité apparente de l'ANT pour l'ADP endogène. L'analyse des résultats est faite de la même façon qu'une analyse cinétique classique.

3.3.4. Le contrôle de la respiration par la créatine en présence du système piège pour l'ADP (PEP-PK)

La MtCK étant une enzyme à deux substrats, ses propriétés cinétiques sont étudiées en présence de concentrations fixées d'un des deux substrats et de concentrations variables du deuxième substrat ou du produit (PCr) (Figure 35).

Pour se faire, la respiration mitochondriale est stimulée d'abord par l'ADP endogène issue de l'hydrolyse de l'ATP exogène par les ATPases (myofibrillaires). Ensuite, l'ADP extramitochondriale est piégé par le système contenant le phosphoenolpyruvate et la pyruvate kinase (PEP-PK). La réaction catalysée par la pyruvate kinase:



piège l'ADP endogène et restitue l'ATP extramitochondriale (mais endogène). L'ajout de concentrations croissantes en créatine en présence d'ATP extramitochondrial, active la MtCK. L'expérience est réalisée en présence de 1, 2, 5, 10 mM d'ATP.

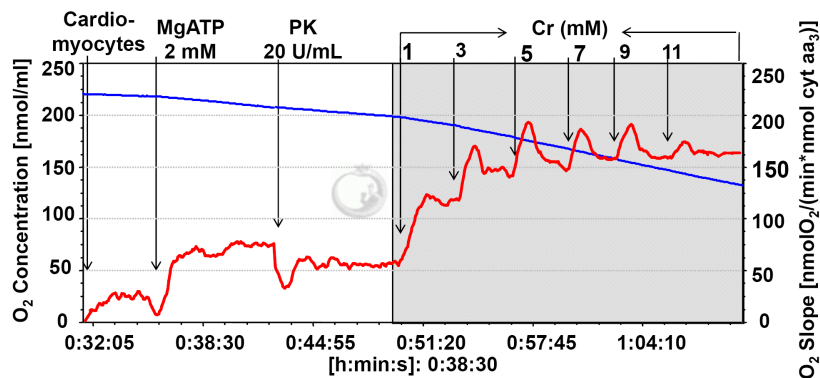
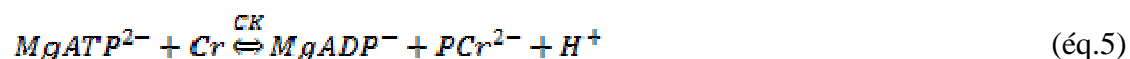


Figure 35

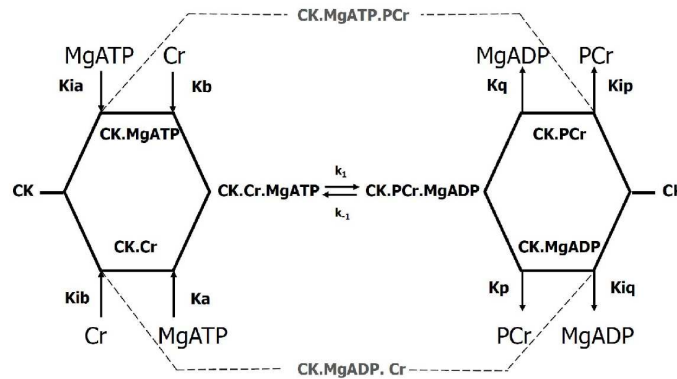
3.3.5. L'analyse cinétique de la réaction catalysée par la créatine kinase.

La CK catalyse la réaction chimique du transfert du groupement P_i entre les nucléotides acétyliques et la créatine conformément l'équation générale :



En conformité avec la classification de Cleland, la réaction catalysée par la CK est une réaction aléatoire, de type Bi-Bi, quasi en équilibre. Le schéma suivant représente l'interconversion des complexes enzymatiques enzyme-substrats CK.Cr.MgATP et enzyme-produits

CK.PCr.MgADP. On va analyser la cinétique de la réaction en présence de l'ATP, créatine et PCr.



Les k_1 et k_{-1} sont les constantes des vitesses de réactions directe et inverse. Les complexes CK.MgATP.PCr et CK.MgADP seront négligés dans notre travail car ils ont de très hautes constantes de dissociation (Saks et al. 1975). Les K_{ia} et K_a sont les constantes de dissociation du MgATP de ses complexes binaires et tertiaires (CK.MgATP et CK.Cr.MgATP respectivement). Les K_{ib} et K_b sont les constantes de dissociation de la créatine de ses complexes binaires et tertiaires (CK.Cr et CK.Cr.MgATP respectivement). La K_{ip} est la constante de dissociation de la PCr de son complexe binaire avec la CK (CK.PCr).

Les constantes de dissociations pour la réaction directe sont données par les équations (éq.6) :

$$K_{ia} = \frac{[CK][MgATP]}{[CK.MgATP]} \quad K_a = \frac{[CK.Cr][MgATP]}{[CK.Cr.MgATP]}$$

$$K_{ib} = \frac{[CK][Cr]}{[CK.Cr]} \quad K_b = \frac{[CK.MgATP][Cr]}{[CK.Cr.MgATP]}$$

$$K_{ip} = \frac{[CK][PCr]}{[CK.PCr]}$$

En conformité avec la loi de conservation de l'enzyme, l'enzyme total $[CK]_t$ peut exister sous cinq formes : forme libre $[CK]_i$ et formes conjugués avec les substrats

$$[CK]_t = [CK]_i + [CK.MgATP] + [CK.Cr.MgATP] + [CK.Cr] + [CK.PCr] \quad (\text{éq.7})$$

En remplaçant dans cette équation les concentrations des complexes enzymatiques par leurs constantes de dissociations (éq.6), on a :

$$[CK]_t = [CK] + \frac{[CK][MgATP]}{K_{ia}} + \frac{[CK.MgATP][Cr]}{K_b} + \frac{[CK][Cr]}{K_{ib}} + \frac{[CK][PCr]}{K_{ip}} \quad (\text{éq.8})$$

Dans une réaction aléatoire, comme c'est le cas pour la réaction de la CK, la variation finale de l'énergie libre de Gibbs est indépendante de la voie empruntée et donc :

$$\Delta G_1^\ddagger + \Delta G_2^\ddagger = \Delta G_3^\ddagger + \Delta G_4^\ddagger \quad (\text{éq.9})$$

$$RT \ln K_{i_a} + RT \ln K_b = RT \ln K_{i_b} + RT \ln K_a \quad (\text{éq.10})$$

$$\ln(K_{i_a} K_b) = \ln(K_{i_b} K_a) \quad (\text{éq.11})$$

$$K_{i_a} K_b = K_{i_b} K_a \quad (\text{éq.12})$$

En simplifiant les constantes de dissociation en utilisant l'équation 12, on peut écrire :

$$[CK]_t = [CK] + \frac{[CK][MgATP]}{K_{i_a}} + \frac{[CK][MgATP][Cr]}{K_{i_a} K_b} + \frac{[CK][Cr]}{K_{i_b}} + \frac{[CK][PCr]}{K_{i_p}} = [CK] \left(1 + \frac{[MgATP]}{K_{i_a}} + \frac{[MgATP][Cr]}{K_{i_a} K_b} + \frac{[Cr]}{K_{i_b}} + \frac{[PCr]}{K_{i_p}} \right) = [CK] D \quad (\text{éq.13})$$

Soit :

$$[CK]_t = [CK] D \quad (\text{éq.14})$$

donc :

$$[CK] = \frac{[CK]_t}{D} \quad (\text{éq.15})$$

et :

$$D = 1 + \frac{[MgATP]}{K_{i_a}} + \frac{[MgATP][Cr]}{K_{i_a} K_b} + \frac{[Cr]}{K_{i_b}} + \frac{[PCr]}{K_{i_p}} \quad (\text{éq.16})$$

La vitesse de réaction directe (ou la vitesse de formation des produits) en conformité avec la loi d'action de masses est :

$$v = k_{cat} [CK \cdot Cr \cdot MgATP] \quad (\text{éq.17})$$

En utilisant l'équation des constantes de dissociation, on peut écrire :

$$v = k_{cat} \frac{[CK][MgATP][Cr]}{K_b} = k_{cat} \frac{[CK][MgATP][Cr]}{K_{i_a} K_b} \quad (\text{éq.18})$$

En remplaçant la [CK] par l'équation 15, on a :

$$v = k_{cat} \frac{[CK]_t}{D} \frac{[MgATP][Cr]}{K_{i_a} K_b} \quad (\text{éq.19})$$

La vitesse maximale de la réaction est égale à :

$$V_m = k_{cat} [CK]_t \quad (\text{éq.20})$$

d'ici :

$$k_{cat} = \frac{V_m}{[CK]_t} \quad (\text{éq.21})$$

On remplace dans l'équation 19 le k_{cat} par l'équation 21 et $[CK]_t$ par l'équation 14, on a :

$$v = \frac{V_m [MgATP][Cr]}{D \quad K_{ia}K_b} \quad (\text{éq.22})$$

En remplaçant D par l'équation 16 et en simplifiant les constantes de dissociation en utilisant l'équation 12, on a :

$$v = \frac{V_m [MgATP][Cr]}{K_{ia}K_b + K_b [MgATP] + K_a [Cr] + [MgATP][Cr] + \frac{K_{ia}K_b}{K_{ip}} [PCr]} \quad (\text{éq.23})$$

Pour déduire les constantes de dissociation des substrats de leurs complexes enzymatiques, on va supposer que la concentration des produits finaux de la réaction est égale à zéro (PCr=0). Dans le cas où les concentrations variables en MgATP et les différentes concentrations fixées en créatine l'inverse de la vitesse de réaction en fonction de l'inverse de la concentration en substrat est :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{[MgATP]}{K_{ia}} + \frac{[MgATP][Cr]}{K_{ia}K_b} + \frac{[Cr]}{K_{ib}} \right) \left(\frac{K_{ia}K_b}{[MgATP][Cr]} \right) \quad (\text{éq.24})$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} \left(\frac{K_{ia}K_b}{[MgATP][Cr]} + \frac{K_b}{[Cr]} + 1 + \frac{K_{ia}K_b}{K_{ib}[MgATP]} \right) \quad (\text{éq.25})$$

Si on simplifie l'équation 24 en utilisant l'équation 12 on a :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} \left(\frac{K_b K_a}{[MgATP][Cr]} + \frac{K_b}{[Cr]} + 1 + \frac{K_a}{[MgATP]} \right) \quad (\text{éq.26})$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{[MgATP]} \left[\frac{1}{V_m} \left(\frac{K_b K_a}{[Cr]} + K_a \right) \right] + \frac{1}{V_m} \left(\frac{K_b}{[Cr]} + 1 \right) \quad (\text{éq.27})$$

$$\frac{1}{v} = \left[\frac{K_a}{V_m} \left(\frac{K_b}{[Cr]} + 1 \right) \right] \frac{1}{[MgATP]} + \frac{1}{V_m} \left(\frac{K_b}{[Cr]} + 1 \right) \quad (\text{éq.28})$$

Cette équation correspond à une équation de régression linéaire de type $y=ax+y_0$ dans laquelle :

la pente (a) est:

$$\alpha_1 = \frac{K_a}{V_m} \left(\frac{K_b}{[Cr]} + 1 \right) \quad (\text{éq.29})$$

et l'ordonnée à l'origine est:

$$l_1 = \frac{1}{V_m} \left(\frac{K_b}{[Cr]} + 1 \right) \quad (\text{éq.30})$$

En condition des concentrations variées de la créatine et différentes concentrations fixées du MgATP créatine, l'équation devient :

$$\frac{1}{v} = \left[\frac{K_b}{V_m} \left(\frac{K_{ia}}{[MgATP]} + 1 \right) \right] \frac{1}{[Cr]} + \frac{1}{V_m} \left(\frac{K_a}{[MgATP]} + 1 \right) \quad (\text{éq.31})$$

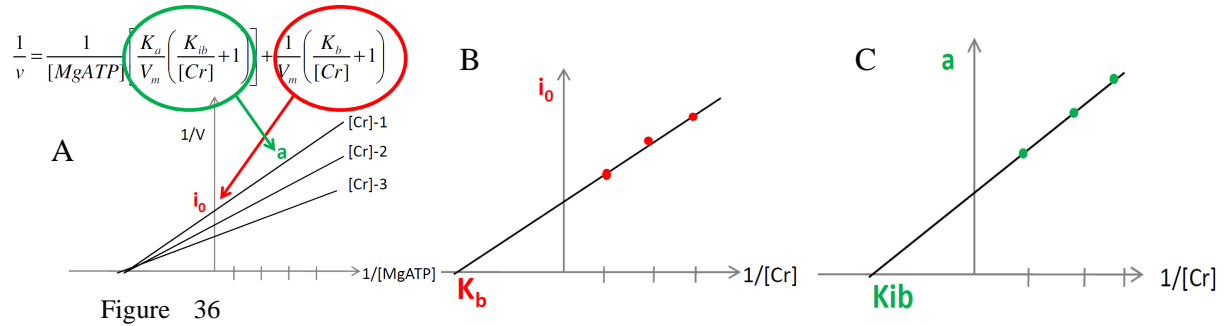
la pente (a) est:

$$\alpha_2 = \frac{K_b}{V_m} \left(\frac{K_{ia}}{[MgATP]} + 1 \right) \quad (\text{éq.32})$$

et l'ordonnée à l'origine est:

$$i_2 = \frac{1}{V_m} \left(\frac{K_a}{[MgATP]} + 1 \right) \quad (\text{éq.33})$$

Les constantes de dissociation (interception avec l'axe des abscisses) de la CK avec le MgATP (K_{ia} et K_a) et la créatine (K_{ib} et K_b) sont déterminées graphiquement en représentant les pentes et les ordonnées à l'origine (précédemment obtenues) en fonction de l'inverse des concentrations en ATP et Cr respectivement (figure 36).



A - Analyse primaire en double inverse $1/V$ en fonction de $1/S$ en condition de la $[Cr]$ fixée et la $[MgATP]$ variable.

B et C – analyse secondaire des pentes et des ordonnées à l'origine en fonction de la concentration du second substrat.

B – Constantes de dissociation du complexe ternaire MtCK.Cr.MgATP pour la créatine (K_b)

C - Constantes de dissociation du complexe binaire MtCK.Cr. pour la créatine (K_{ib})

La constante de dissociation de la PCr (K_{ip}) du complexe CK.PCr est calculée à partir de l'équation de la vitesse de réaction (éq.23) :

$$v = \frac{V_m [MgATP] [Cr]}{K_{ia} K_b + K_b [MgATP] + K_a [Cr] + [MgATP] [Cr] + \frac{K_{ia} K_b [PCr]}{K_{ip}}} \quad (\text{éq.34})$$

Le double inverse de cette équation donne :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_{ia} K_b}{V_m [MgATP] [Cr]} + \frac{K_b}{V_m [Cr]} + \frac{K_a}{V_m [MgATP]} + \frac{1}{V_m} + \frac{K_{ia} K_b [PCr]}{K_{ip} V_m [MgATP] [Cr]} = \left[\frac{K_{ia} K_b}{V_m} \left(1 + \frac{[PCr]}{K_{ip}} \right) \cdot \frac{1}{[MgATP]} + \frac{K_b}{V_m} \right] \cdot \frac{1}{[Cr]} + \frac{K_a}{V_m [MgATP]} + \frac{1}{V_m} \quad (\text{éq.35})$$

Le pente de régression en double inverse ($1/v$ en fonction de $1/[Cr]$ en présence des concentrations variables de la PCr et du MgATP) est donnée par l'équation :

$$s_3 = \frac{K_{ia} K_b}{V_m} \left(1 + \frac{[PCr]}{K_{ip}} \right) \frac{1}{[MgATP]} + \frac{1}{V_m K_a} \quad (\text{éq.36})$$

Le graphique construit en utilisant en ordonnée les valeurs de ces pentes en fonction des $[PCr]$ est décrite par l'équation :

$$S = \frac{K_{tq} K_b}{V_m} \left(1 + \frac{[PCr]}{K_{tp}} \right) \quad (\text{éq.37})$$

L'intersection de la pente avec l'axe des abscisses donne directement la constante de dissociation de la PCr de son complexe binaire avec la CK, CK.PCr.

3.3.6. Traitement des fibres cardiaques avec la doxorubicine

La DOXORUBICINE (Adriamycine™) fait partie de la famille des anthracyclines. Elle inhibe la synthèse de l'ADN et de l'ARN en s'intercalant dans sa structure donc la multiplication cellulaire.

Le cœur du rat Wistar est perfusé en présence ou en absence de 2 µM de doxorubicine (DOX) pendant 2 h puis les fibres musculaires sont prélevées du ventricule gauche après la perfusion, et perméabilisées à la saponine directement dans la chambre d'oxygraphe en présence de 2, 4, 8, 16, 32, 100, 200 et 500 µM DOX pendant 20 min à 25°C. La respiration basale (V_0) et stimulée par 2 mM ADP (V_{\max}) est mesurée en présence soit de 5 mM glutamate et de 2 mM malate, soit de 50 µM palmytoil-L-carnitine et de 2 mM malate. Les consommations de l'oxygène (V_0 et V_{\max} ADP) des fibres perméabilisées en provenance du cœur perfusé avec 2 µM de DOX et des fibres non perfusées avec la DOX mais pré-incubées avec 2 µM de DOX avant les mesures d'oxygraphie, sont mesurées ainsi que son effet sur la régulation de la respiration mitochondriale.

4. Spectrophotométrie

4.1. Principe

Un spectrophotomètre mesure la lumière absorbée par une solution (échantillon) à une longueur d'onde donnée, ce qui permet d'en déduire la concentration, et de ce fait, la cinétique de réaction (détermination d'activités enzymatiques).

Le spectrophotomètre donne directement le $\log I/I_0$ appelé densité optique (DO) ou absorbance (grandeur sans dimension), où I_0 est l'intensité du faisceau de lumière incidente et I l'intensité du faisceau de lumière émergeant après passage au travers de la solution. A chaque longueur d'onde, l'absorption de la lumière par une molécule en solution dépend de la concentration de cette molécule (C , $M \cdot L^{-1}$) et du chemin optique (L , cm) parcouru par la lumière à l'intérieur de la solution. En conformité avec la loi de Lambert-Beer: $DO = \epsilon LC$ où ϵ

est une constante caractéristique de l'espèce moléculaire (l'absorption moléculaire ou extinction moléculaire, ϵ s'exprime en $L \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$). Pour notre étude, nous avons utilisé le spectrophotomètre Cary 50 Bio, Varian, Palo Alto, USA.

4.2. L'appréciation de la concentration en cytochrome aa₃

Le contenu en cytochrome aa₃ est mesuré dans les mitochondries et les cardiomyocytes afin de normaliser la vitesse de consommation d'oxygène en fonction de la concentration en cyt aa₃ dans ces deux modèles utilisés. La concentration en cytochrome aa₃ est mesurée par spectrophotométrie en conformité avec la méthode décrite par Fuller (Fuller et al. 1985). Les cellules ou les mitochondries sont solubilisées dans un tampon phosphate (100 mM KH₂PO₄, pH = 8) contenant 1 % de sodium deoxycholate. Les spectres de 400 à 650 nm dans les conditions de réduction (avec des cristaux de sodium dithionite) et d'oxydation des cytochromes sont obtenus et soustraits l'un de l'autre (Figure 37).

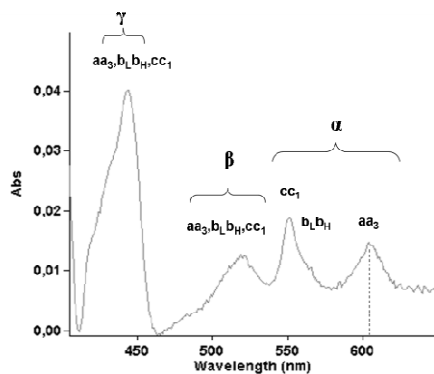


Figure 37

La valeur du pic correspondant à 605 nm correspond au contenu en cytochrome aa₃ (cytochrome c oxidase). Le coefficient d'extinction molaire ϵ est égal à $24 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Van Gelder 1966).

5. Chromatographie en phase liquide de haute performance et de ultra-performance avec des paires d'ions (HPLC/UPLC – High Performance liquid chromatography)

Afin d'évaluer en quelle mesure la MtCK prend le contrôle sur l'oxydation phosphorylante *in situ*, dans les cardiomyocytes, nous avons mesuré la production de la PCr lors des mêmes conditions que celles réalisées pour les cinétique de la créatine en oxygraphie (cf.§ II.3.3.4). Le flux de production de PC rapporté à la vitesse de consommation d'O₂ donne l'efficacité du contrôle respiratoire par la créatine (ou MtCK). Les mesures de la production de la PCr sont réalisées en utilisant la technique de chromatographie liquide de haute performance (HPLC) et d'UPLC.

Les échantillons de 100 µl sont prélevés avant le rajout de la créatine et aux 3, 6 et 10ème minute de la réaction, acidifiés (200 µl 1 M HClO₄ (à 4°C), 5 µl 100 mM EDTA) et neutralisés (0,5 – 1 min avec 210 µl de 0.952 M KOH). Ils sont ensuite centrifugés pendant 2 – 3 min à 16 000 g et 4°C. Le surnageant est immédiatement congelé (-40°C) et analysé 5 – 6 heures plus tard. La séparation de la créatine, de la PCr et des nucléotides adényliques est réalisée (colonne 2.1 x 100 mm ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ avec 1.7 particule de µm, Waters) en enregistrant la densité optique simultanément à 210 nm pour la créatine et la PCr et à 254 nm pour les nucléotides adényliques. Le volume d'échantillon de 10 µl est injecté automatiquement. La phase mobile consiste en un tampon A (20 mM KH₂PO₄, 3 mM tetrabutylammonium bisulfate (TBAS)) et un tampon B (200 mM KH₂PO₄, 10% (v/v) acetonitrile, 0.3 mM TBAS), les deux ajustés à pH 5.0 avec 2 M phosphoric acid et filtré (filtre de 0.2 µm). L'élution est réalisée dans le tampon A pendant 2 min (0.4 ml/min) suivie par l'élution (gradient 1:1) avec les tampons A et B pendant 8,5 min et ensuite avec le tampon B pendant 10 min, le temps total d'analyse étant estimé de 20 min. Le temps de rétention des métabolites est de 0.63 min pour la Cr, de 1.70 min pour la PCr, de 6.33 min pour l'AMP (traces), de 6.95 min pour l'ADP et de 7.29 min pour l'ATP ($\Delta = \pm 0.01$ min). L'aire sous la courbe de chaque pic est calculée puis la concentration de chaque métabolite est déterminée en fonction de la courbe de calibration.

6. La détermination de la concentration des protéines

Les mitochondries et les cellules sont préalablement lysées avec le tampon Ripa. La concentration en protéines est déterminée en utilisant le kit BCA (Pierce, USA).

7. La microscopie confocale

Les mitochondries sont marquées en utilisant une sonde fluorescente, le MitoTracker Red™ et visualisées par microscope confocale (Leica DM IRE2, objectif 63X à immersion à eau). Le principe de fonctionnement du microscope est basé sur l'excitation par le laser d'émission des photons par la sonde fluorescente dans un point focalisé dans la profondeur de l'échantillon. Pour imager la surface complète, la vibration extrêmement rapide des miroirs oriente le faisceau laser de façon à balayer la surface choisie d'échantillon. Le point focal peut être positionné aux différents niveaux de pénétration de l'échantillon. Le logiciel reconstruit ensuite l'image analysée.

Les cardiomyocytes non perméabilisés ont été marqués pendant 30 min à la température ambiante avec 200 nM de MitoTracker Red™ (Molecular Probes, Eugene, OR). La sonde diffuse passivement à travers le sarcolemme et s'accumule dans les mitochondries vivantes. La longueur d'onde d'excitation est de 543 nm (Helium-Neon laser) et d'émission 580 nm.

8. Etude clinique : biopsie musculaire

Dans l'étude ont été inclus 9 patients atteints de bronchopneumopathie obstructive bronchique (BPCO) modérée (stade II-III d'après la classification GOLD (Global Obstructive Lung Diseases)) et 9 volontaires sains appariés en fonction de l'âge, du sexe et du niveau d'activité physique.

Deux biopsies du muscle vaste externe sont réalisées sur chaque participant (Localisation : face antéro-externe de la cuisse, jonction 1/3 inférieur - 1/3 moyen du segment joignant l'interligne fémoro-tibial et l'épine iliaque antéro-supérieure), une biopsie réalisée avant la réhabilitation et une après trois mois de réhabilitation qui inclut un entraînement en endurance sur le vélo ergométrique. Les biopsies sont réalisées sur le même muscle sous anesthésie locale (peau et tissu sous-cutané) avec la 2% Xylocaïne. La peau et l'aponévrose sont ouvertes sur une longueur de 6 à 10 mm. La biopsie est réalisée à la profondeur d'un cm

avec l'aiguille de Bergström pour les biopsies musculaires (5mm de diamètre). La plaie est fermée sans sutures, uniquement par bandes adhésives maintenues en place pendant 5 jours. Cette technique permet de prélever un fragment moyen de 200 à 300 mg de tissu musculaire. Le tissu musculaire est utilisé pour l'étude de la respiration mitochondriale en oxygraphie (80 mg), pour l'étude histologique (morphométrie, histochimie) (40-60 mg), pour l'étude de l'expression des gènes par le micro-array (60 mg) et pour l'étude de stress oxydant (40 mg).

Le tissu destiné pour l'étude de la respiration mitochondriale est plongé directement dans la solution de conservation contenant des métabolites énergétiques (ATP, PCr) à 4°C. Après une légère dilacération afin de permettre l'accès à l'O₂ aux fibres, l'échantillon est transporté au laboratoire où il est soumis à la procédure de dilacération et de perméabilisation en conformité avec le protocole décrit pour le tissu animale (cf. §I.2).

La mesure de la vitesse de consommation de l'O₂ par oxygraphie a inclus :

- la mesure de la vitesse basale et maximale stimulée par 2 mM d'ADP, afin de calculer l'ACR (V_m/V₀)
- le contrôle de la respiration par l'ADP, en absence et en présence de créatine
- le contrôle de la respiration par la créatine en présence du système piège pour l'ADP (PEP-PK)

Le tissu musculaire destiné pour l'étude histologique a été congelé dans un récipient rempli d'isopentane, plongé lui-même dans l'azote liquide.

Le typage des fibres musculaires est réalisé par histochimie par détermination de l'activité de la myosine ATPase selon la technique de Mabuchi (Mabuchi et Sreter 1980a, 1980b), récemment décrite par Whittom (Whittom et al. 1998). Ce dosage, réalisé sur des coupes de tissu musculaire, repose sur l'activité différenciée de la myosine ATPase en fonction du type de fibres. L'action de cette enzyme dégrade l'ATP en ADP + Pi. Les ions Pi produits par cette réaction, se combinent avec les ions calcium du mélange réactionnel pour former du phosphate de calcium. Ce précipité insoluble et presque incolore est transformé en phosphate de cobalt puis en sulfate de cobalt. Ce dernier s'identifie facilement par sa coloration brun-noir. L'intensité de la coloration permet de différencier les fibres de type I (non marquées) et des fibres de type IIx (franchement sombres).

Les tissus, destinés pour l'étude des ARN et du stress oxydant, sont placés dans des cryotubes et congelés directement dans l'azote liquide pour être stocker ensuite à -80°C jusqu'à l'analyse, qui n'est pas encore réalisée.

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le programme SPSS 17.0. Les résultats présentés en Moyenne \pm Erreur type de la Moyenne (SEM). Le teste Student-t a été utilisé.

III. Solutions

- 1. Solution de sucrose pour l'isolement des mitochondries:** 300 mM sucrose, 10 mM HEPES, pH 7,2, and 0,2 mM EDTA
- 2. Solution d'isolement des cardiomyocytes:** 117 mM NaCl, 5,7 mM KCl, 4,4 mM NaHCO₃, 1,5 mM KH₂PO₄, 1,7 mM MgCl₂, 11,7 mM glucose, 10 mM creatine, 20 mM taurine, 10 mM PCr, 2 mM pyruvate and 21 mM HEPES, pH 7.1
- 3. Solution de conservation des fibres :** 1,9 mM CaK₂EGTA, 8,1 mM K₂EGTA, 20 mM Imidazole, 0,5 mM DTT, 9,5 mM MgCL₂, 50 mM K-MES, 20 mM Taurine, 2,5 mM Na₂ATP, 20 mM PCr, pH 7,1
- 4. Solution Mitomed:** 0,5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂(6H₂O), 60 mM K-Lactobionat, 3 mM KH₂PO₄, 20 mM Taurine, 20 mM HEPES, 110 mM Sucrose, 0,5 mM DTT, pH 7,1
- 5. Tampon CRC** (pour l'ouverture des PTP) : 250 mM Succrose, 10 mM Pi-Tris, 10 mM Tris-MOPS. Chelex
- 6. Milieu de culture pour le lignée des cellules HL-1 :** Claycomb medium supplémenté avec : 0,3 mM acide ascorbique, 100 μ M norepinephrine, 2 mM L-glutamine, 100U/mM-100 μ g/mL penicilline/streptomycin, 10% fetal bovine serum

RESULTATS

1^{ère} étude expérimentale:

ETUDE COMPARATIVE DES DIFFERENTES CINETIQUES DE REGULATION DE LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE DANS LES CARDIOMYOCYTES PERMEABILISES ET LES CELLULES CARDIAQUES HL-1 NB : IMPORTANCE DE L'ORGANISATION STRUCTURALE DANS LA REGULATION DE LA RESPIRATION CELLULAIRE (article 4).

L'objectif de ce travail était d'étudier les mécanismes cellulaires de régulation de la respiration mitochondriale des cellules cardiaques en fonction de leur organisation structurale. Les cellules cardiaques adultes de cœur de rat et les cellules HL-1 non-battantes (HL-1 NB) tumorales de cœur de souris ont été choisies comme modèles expérimentaux.

Dans les cellules cardiaques adultes sont caractérisées par leur organisation régulière des sarcomères et des mitochondries (Figure 28A), les mitochondries sont couplées fonctionnellement aux multiples processus intracellulaires consommant de l'ATP par l'intermédiaire de réseaux de transfert des groupements P_i au sein des modules énergétiques nommés unités énergétiques intracellulaires (Saks et al. 2001).

Par contre, les cellules HL-1 NB sont issues d'une lignée de cellules atriales tumorales, en prolifération continue, qui, néanmoins, présente les caractéristiques d'une cellule cardiaque, puisqu'elles expriment la desmine, la connexine 43, la myosine sous forme libre, les récepteurs cardiaques dihydropyridine, le transporteur (échangeur) Na^+/Ca^{2+} . Ces cellules ne se contractent pas puisqu'elles sont dépourvues de structures sarcomériques et possèdent un réseau mitochondriale irrégulier et dynamiques (Figure 28B) (Beraud et al. 2009, Pelloux et al. 2006).

Nos résultats montrent que, dans les cellules HL-1 NB, le niveau de respiration stimulée par 2 mM d'ADP (stade 3, d'après Chance) est significativement plus bas par rapport à celui mesuré dans les cardiomyocytes ($3,6-6,7 \text{ nmolO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protéines}$ et $40-60 \text{ nmolO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protéines}$, respectivement). De plus, le rapport entre les niveaux de respiration en stade 3 et en stade 2 (en présence du glutamate/malate) est égal à 3 pour les cellules HL-1 NB et à 7-9 pour les cellules cardiaques adultes.

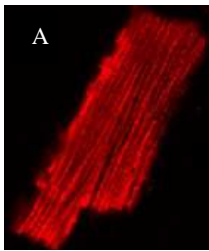


Figure 28A et B. Image de microscopie fluorescente confocale (Leika ...). Figure 28A montre le réseau hautement organisé de mitochondries du cardiomyocyte adulte marqué avec MitoTracker® Deep Red.

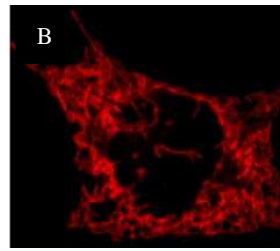


Figure 28B. Marquage des mitochondries d'une cellule HL-1 non battante avec MitoTracker® Deep Red. Réseau des mitochondriales filamenteuses, dynamiques.

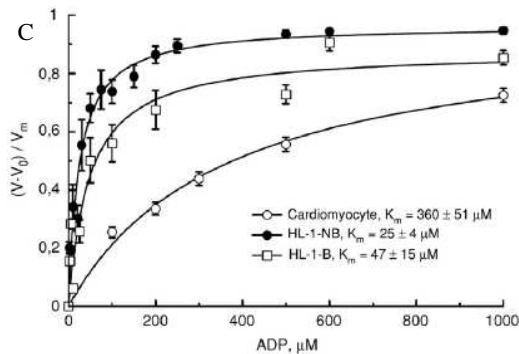


Figure 28C montre la représentation graphique de la respiration mitochondriale des différents types de cellules en fonction de la concentration variable de l'ADP.

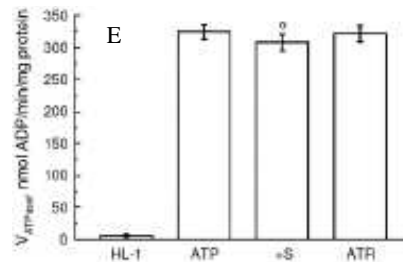
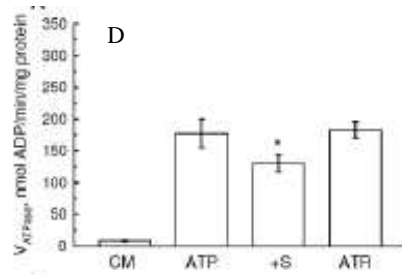


Figure 28D et E représentent la mesure spectrophotométrique de l'activité des ATPases en présence du système d'enzymes couplés PEP-PK-LDH, oxydant 1 mole NADH pour chaque mole d'ADP consommé. Le flux d'ADP extramitochondriale issu de l'hydrolyse de l'ATP par les ATPases diminue en présence des substrats respiratoires (+S) dans les cardiomyocytes (Figure 28F) et ne change pas dans les cellules HL-1NB (Figure 28G), montrant une insuffisance fonctionnelle de l'ajustement de l'utilisation et de la synthèse de l'ATP par les mitochondries des cellules HL-1NB. (Les images sont pris de Anmann et al. 2006)

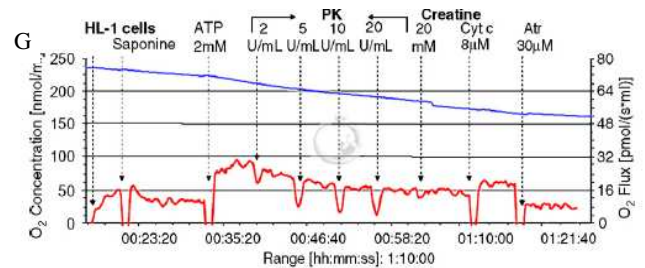
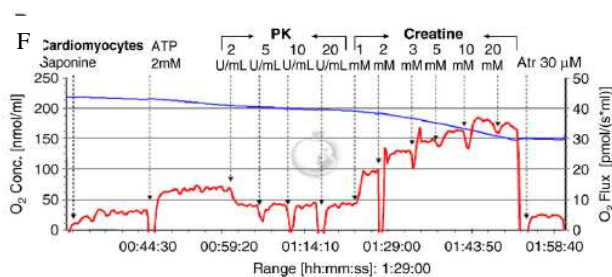


Figure 28F et G montrent les tracés d'oxygraphie (Oroboros 2K) de la respiration des cardiomyocytes perméabilisées (Figure 28C) stimulées par des concentrations croissantes de créatine en présence de l'ATP et du système piège pour l'ADP libre (PEP-PK). Figure 28D montre l'absence de la stimulation de la respiration des cellules HL-1NB par la créatine. L'axe gauche et la courbe bleu correspond à la consommation de l'O₂, l'axe droite et la courbe rouge – le flux de consommation de l'O₂.

Dans les cellules HL-1 NB, le K_m apparent pour l'ADP libre est proche des valeurs caractéristiques pour les mitochondries cardiaques isolées ($K_m^{app}ADP$ 25 ± 4 μM) contrairement aux cardiomyocytes perméabilisés pour lesquels le $K_m^{app}ADP$ est d'environ de 300 μM (Figure 28C). Le traitement protéolytique par 1 μM de trypsine provoque une désorganisation de la structure cellulaire des cardiomyocytes associée à une diminution du K_m^{app} pour l'ADP libre et la stimulation de la respiration par l'ADP libre reste inchangée dans les cellules HL-1 NB. De plus, aucune différence significative entre le K_m^{app} pour l'ADP libre en absence et en présence de la créatine n'a été observée.

Afin de mieux comprendre ces différences de régulation de la respiration mitochondriale par la créatine, l'affinité de la MtCK pour la créatine a été étudiée. Pour ce faire, la respiration mitochondriale est stimulée par l'ADP endogène issu de l'hydrolyse de l'ATP exogène. Puis, les flux extra-mitochondriaux d'ADP libres sont piégés par le système PEP-PK rajouté au milieu expérimental. Dans ces conditions, une titration avec des concentrations croissantes de créatine (de 1 à 10 mM) est réalisée. Notre première grande observation est que de faibles concentrations en créatine ($K_m^{app}Cr$ $\sim 2,5$ mM) activent rapidement la respiration des cardiomyocytes perméabilisés jusqu'à la V_{max} (correspondant au stade 3 de la respiration, d'après Chance, Figure 28F). L'autre observation importante était l'absence de l'activation de la respiration mitochondriale par la créatine dans les cellules HL-1NB dans les mêmes conditions (Figure 28G).

Aussi, la régulation de la respiration mitochondriale dans ces deux types de cellules a été également étudiée en suivant les flux d'ADP mitochondriaux, issus de l'hydrolyse de l'ATP exogène par les ATPases cytosoliques, par spectrophotométrie. Les flux d'ADP sont estimés en suivant la diminution de la densité optique du NADH, provoquée par sa consommation dans les réactions d'enzymes couplées PK-LDH. Dans les cellules cardiaques adultes, la respiration mitochondriale activée utilise l'ADP libre en diminuant (presque 2 fois) les flux d'ADP disponibles pour les réactions de la PK et de la LDH (Figure 28E). La même étude, réalisée sur les cellules HL-1 NB, ne révèle pas de modification significative des flux d'ADP en présence des mitochondries activées (Figure 28E). Ces résultats montrent une altération de la régulation de la respiration mitochondriale avec un mauvais ajustement entre l'utilisation et la production de l'ATP.

Nous venons de montrer que **la régulation de la respiration mitochondriale des cellules cardiaques perméabilisées est dépendent du niveau d'organisation cellulaire**. Dans les **cellules cardiaques adultes**, les mitochondries hautement organisées ont une faible affinité pour l'ADP libre, une forte affinité pour la créatine et sont capable d'ajuster

rapidement la régénération de l'ATP grâce à son hydrolyse par les ATPases cytosoliques. Par contre, dans les **cellules HL-1 NB**, les mitochondries dynamiques, formant des réseaux irréguliers, ont une affinité très élevée pour l'ADP libre, comparable à celle des mitochondries isolées et ne répondent pas à la stimulation par la créatine et ne participent pas à la régulation des flux d'ADP intracellulaires : il n'y a pas de transfert direct de l'ADP entre les mitochondries et les ATPases cytosoliques dans ces cellules. Ultérieurement, il a été montré que les cellules HL-1 NB possèdent un profil métabolique glycolytique avec une activité totale de la créatine kinase basse et une haute activité de l'hexokinase II (enzyme spécifique pour le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses) (Monge et al. 2009).

L'étude suivante va nous permettre d'approfondir ces résultats et de suivre la cinétique de la régulation de la respiration mitochondriale par la créatine *in situ* dans les cellules cardiaques perméabilisées.

2^{ème} étude expérimentale:

ETUDE DE LA REGULATION DE LA RESPIRATION *IN SITU* CONTROLEE PAR LA MtCK ET DE LA MESURE DIRECTE DES FLUX ENERGETIQUES DES MITOCHONDRIES VERS LE CYTOPLASME DANS LES CELLULES CARDIAQUES PERMEABILISEES : importances des propriétés au niveau du système et quelques évidences en faveur de l'interactosome mitochondrial (articles 5 et 6).

Lors de cette étude nous avons suivi deux grands objectifs :

- l'étude **des propriétés cinétiques de la créatine kinase mitochondriale *in situ* dans les cardiomyocytes perméabilisés et son rôle dans la régulation de la respiration mitochondriale et,**
- l'étude **du rôle de la membrane externe mitochondriale dans la régulation de la respiration de la mitochondrie *in situ* dans les cardiomyocytes perméabilisés.**

Deux grands modèles expérimentaux ont été étudiés lors de ce travail : les mitochondries cardiaques isolées (*in vitro*) comme modèle de référence (Figure 29A et 29A) et les cardiomyocytes perméabilisés (la mitochondrie *in situ*) comme modèle d'étude (Figure 31A et 32A). Les expériences ont été réalisées dans les conditions suivantes: premièrement, en présence de la réaction MtCK nonactivée ou activée et, deuxièmement, en présence de la réaction de la MtCK activée et du système piège (PEP-PK) pour l'ADP libre.

Tout d'abord, une série de tests est effectuée sur les mitochondries isolées (Figure 29 et 30) et sur les cardiomyocytes perméabilisés (Figure 31) afin d'évaluer les propriétés du système expérimental (Figure 31).

En absence d'un système de recyclage de l'ADP, la mitochondrie isolée stimulée par des concentrations faibles d'ADP (0,2-0,4 mM) ne peut pas maintenir un niveau stable de respiration (Figure 29B). En présence de la créatine, le Stade 3 de la respiration (Chance et Williams 1956), devient stable (Figure 29C). **Le contrôle de la phosphorylation oxydative dans ce cas est réalisé par la MtCK activée grâce au recyclage localisé de l'ADP endogène.**

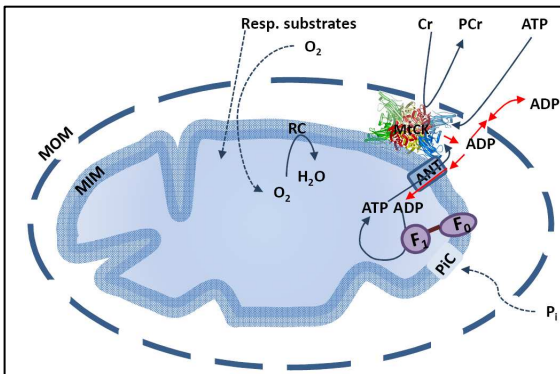


Figure 29A. Modèle expérimentale – mitochondrie isolée. La respiration mitochondriale est stimulée par la créatine en présence de l'ATP, glutamate, malate

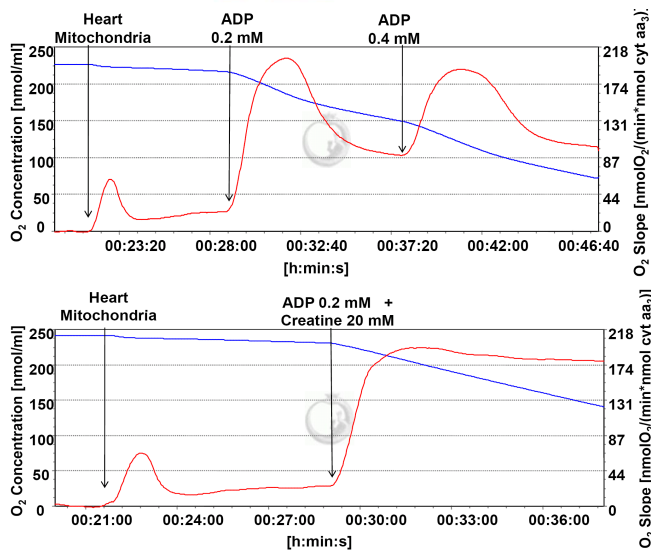


Figure 29B. La respiration des mitochondries isolées stimulée avec 0,2 et 0,4 mM ADP est instable à cause de l'absence du recyclage de l'ADP

Figure 29C. La respiration en stade 3 (d'après Chance) des mitochondries isolées devient stable en présence de la créatine.

Le système piège PEP-PK rajouté aux mitochondries isolées inhibe partiellement (~50%) la respiration mitochondriale stimulée par la créatine en présence d'ATP (i.e MtCK activée) ((Figure 30A, Figure 30B). Cette inhibition, est due à la sortie de l'ADP de l'espace inter-membranaire mitochondriale dans le milieu. Ce test a été proposé pour la première fois par Gellerich afin de montrer le rôle de la perméabilité de la membrane externe mitochondriale dans la régulation de la respiration mitochondriale, dans le cadre de son hypothèse de compartimentation dynamique (Gellerich et Saks 1982). En effet, la perméabilité de la membrane externe des mitochondries isolées pour l'ADP est un paramètre très important (Figure 30B) et dépend de la procédure d'isolement car cette procédure doit totalement détruire les interconnexions des mitochondries avec les protéines du cytosquelette.

En effet, cette haute sélectivité de la membrane mitochondriale externe peut être due, conformément aux publications récentes, à la modification de la perméabilité du VDAC qui est dépendant de la fixation des hétérodimères de tubuline (le K_m apparent pour l'ADP libre

est dépendent de la présence de la tubuline dans l'échantillon des mitochondries isolées, partie du travail réalisée par C.Monge).

Tout d'abord, nous nous sommes assurés de l'efficacité du système piège pour l'ADP. Différentes quantités d'ADP ont été rajoutées en présence du système piège PEP-PK aux mitochondries isolées stimulées par l'ATP (Figure 30C). Le résultat de ce test montre que **l'ADP ne stimule pas la respiration des mitochondries isolées en présence de ce système.** Puis, nous avons étudié le rôle de la membrane externe des mitochondries isolées dans la régulation de la respiration, mais cette fois en présence de la MtCK activée. Des concentrations croissantes en créatine (en présence de l'ATP) ont été ajoutées aux mitochondries isolées après avoir piégé l'ADP libre par le système PEP-PK (Figure 30D). Nous avons observé que la créatine stimule la respiration mitochondriale (~50% V_{max}) même en présence d'un système puissant consommant tous l'ADP accessible dans le milieu. **La préservation partielle de la respiration mitochondriale contrôlée par la MtCK activée en présence du système piège pour l'ADP indique l'existence d'un couplage fonctionnel entre la MtCK et l'ANT qui est responsable de l'acheminement directe de l'ATP et de l'ADP entre la matrice mitochondriale et la MtCK.**

Les résultats obtenus permettent de valider le modèle de référence en se basant sur les conclusions déjà publiées et obtenues expérimentalement (Gellerich et Saks 1982, Jacobus et Saks 1982) et mathématiquement (Vendelin et al. 2000).

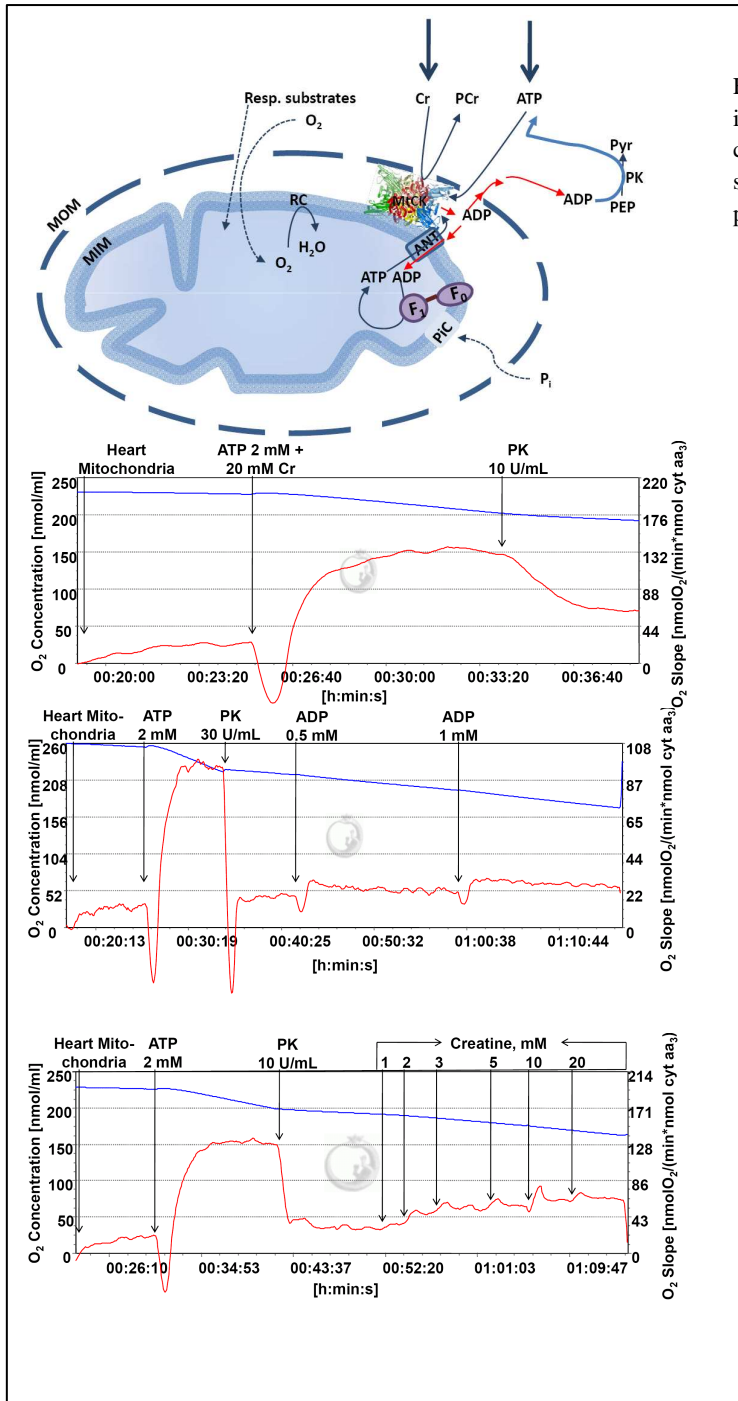


Figure 30A. Schéma du modèle expérimentale – mitochondrie isolée. La respiration mitochondriale est stimulée par la créatine en présence de l'ATP, glutamate, malate et le système piège pour l'ADP libre constitué du phosphoénolpyruvate (PEP) et du pyruvate kinase (PK).

Figure 30B. L'inhibition partielle par le système PEP-PK de la respiration des mitochondries isolées stimulée par la créatine en présence de l'ATP.

Figure 30C. L'ADP rajoutée aux mitochondries isolées en présence du système piège PEP-PK ne stimule pas la respiration.

Figure 30D. La respiration mitochondriale est stimulée initialement par le rajout de 2 mM ATP en présence de 5 mM glutamate et 2 mM malate comme substrats respiratoire. En présence de 10 U/mL PK et 5 mM PEP nous avons observé une inhibition importante de la respiration. Néanmoins, la créatine, rajoutée dans ces conditions en concentration croissantes stimule partiellement la respiration.

Dans les cardiomyocytes perméabilisés, le stade 3 de la respiration mitochondriale (d'après Chance) est maintenu grâce à la stimulation continue par l'ADP issue de l'hydrolyse de l'ATP mitochondriale par les ATPases (Figure 31B). La stimulation de la respiration des cardiomyocytes perméabilisés par des concentrations croissantes en ATP en absence et en présence de créatine (Figure 31C) montre une différence importante dans le comportement du modèle expérimentale. Le K_m apparent pour l'ATP exogène en présence de créatine diminue 6 fois par rapport au K_m^{app} en absence de la MtCK activée (Figure 31C). En présence de l'ATP exogène et de la MtCK activée, la respiration des cardiomyocytes perméabilisés est stimulée par deux sources l'ADP endogène extramitochondriale : soit issue de la réaction de l'hydrolyse de l'ATP exogène, soit de l'ADP endogène produit localement par la MtCK activée (Figure 31A). **L'activation plus rapide de la respiration des cardiomyocytes perméabilisés stimulée par la créatine en présence de l'ATP exogène par rapport à la stimulation uniquement par l'ATP exogène est due au contrôle préférentiel de la phosphorylation oxydative par la MtCK Couplée avec l'ANT (comme nous allons le voir).**

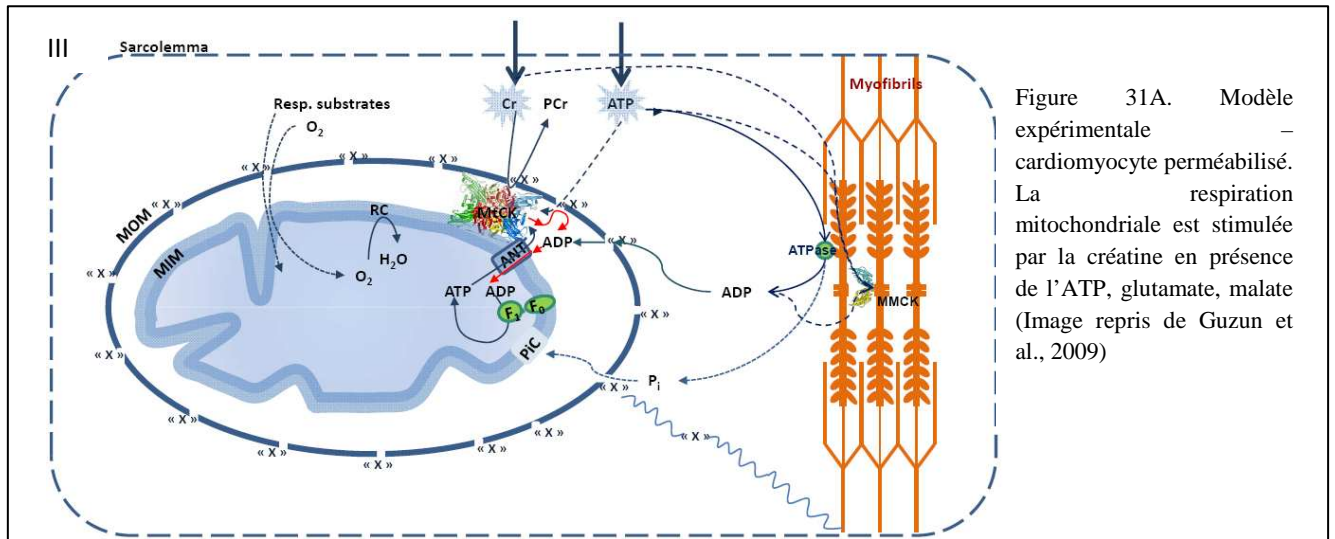


Figure 31A. Modèle expérimentale – cardiomyocyte perméabilisé. La respiration mitochondriale est stimulée par la créatine en présence de l'ATP, glutamate, malate (Image repris de Guzun et al., 2009)

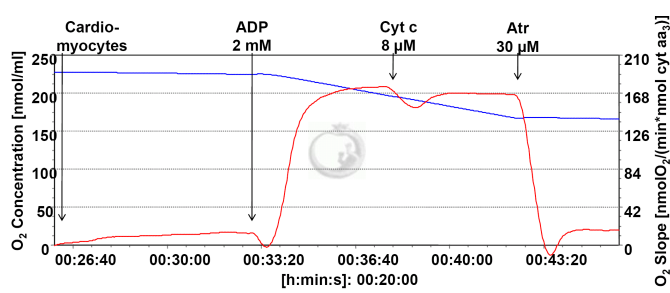


Figure 31B. Les cardiomyocytes sont perméabilisés directement dans la chambre d'oxygraphe (25 μg/mL Saponine, 10 min, 25°C, agitation). Le niveau de respiration stimulé par ADP est stable. L'ACR (acceptor control ratio) V_{max}/V_0 est 10. Le cytochrome c n'induit pas de stimulation de la respiration, témoignant de l'intégrité de la membrane mitochondriale externe. Sous action de l'atractyloside le niveau de respiration revient à la V_0 , témoignant de l'intégrité de la membrane mitochondriale interne.

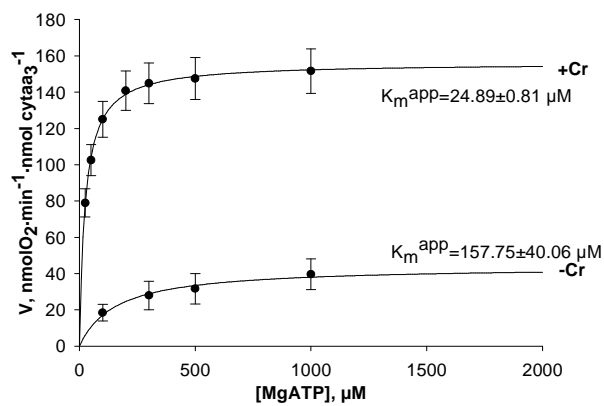


Figure 31C. La cinétique de la régulation de la respiration mitochondriale des cardiomyocytes perméabilisés par l'ATP exogène en absence et en présence de la créatine.

La plupart des tests et les conclusions faites à partir des études du modèle de référence, les mitochondries isolées, et des cardiomyocytes perméabilisés (décrites plus haut) n'apportent pas de nouvelles connaissances, mais, néanmoins, ont été nécessaires pour valider le modèle expérimentale destiné à l'étude des propriétés cinétique de la MtCK *in situ* et de son rôle dans la régulation de la respiration d'une cellule cardiaque vivante. Les propriétés recherchées sont les suivantes :

- le couplage fonctionnel de la MtCK avec l'ANT qui devrait assurer l'acheminement efficace des nucléotides adényliques entre la MtCK et la matrice mitochondriale,
- la compartimentation des métabolites adényliques dans l'espace inter membranaire grâce, en partie, à la fonction de barrière de la membrane mitochondriale externe,
- la réalisation de ces deux conditions qui permettrait de relier la consommation de l'oxygène par la cellule perméabilisée à la rephosphorylation de l'ADP produit localement par la MtCK.

La première propriété, le couplage fonctionnel MtCK-ANT, est testée sur les mitochondries isolées (Figure 30A, B, D). Pour tester la deuxième condition, le rôle de la membrane mitochondriale externe dans la régulation de la respiration dans les cardiomyocytes perméabilisé, nous avons répété l'expérience de Gellerich (Gellerich et Saks 1982) avec l'utilisation du système piège pour l'ADP, PEP-PK. Ce système rajouté aux cardiomyocytes perméabilisés, stimulés par la créatine et l'ATP, autrement dit, en présence de la MtCK activée n'inhibe pas la respiration. (Figure 32A, D). **Ce résultat est très important car l'absence de l'inhibition de la respiration, contrôlée par la MtCK en présence du système piégeant l'ADP, est due à la restriction de diffusion de l'ADP au niveau de la membrane externe mitochondriale (ie l'absence de sortie de l'ADP de l'espace intermembranaire) des cardiomyocytes perméabilisés.** Par contre, dans les mitochondries isolées (Figure 30B), et dans les cardiomyocytes perméabilisés, en présence du système piégeant l'ADP libre (PEP-PK), un traitement protéolytique (trypsine 0,2 μ M, 5 min, 30°C) provoque une inhibition importante de la respiration stimulée par la créatine (i.e. la MtCK activée) (Figure 32C, E). Ces deux expériences mettent en évidence l'importance des interactions de la membrane externe mitochondriale avec les protéines cellulaires pour sa fonction de barrière de diffusion pour l'ADP.

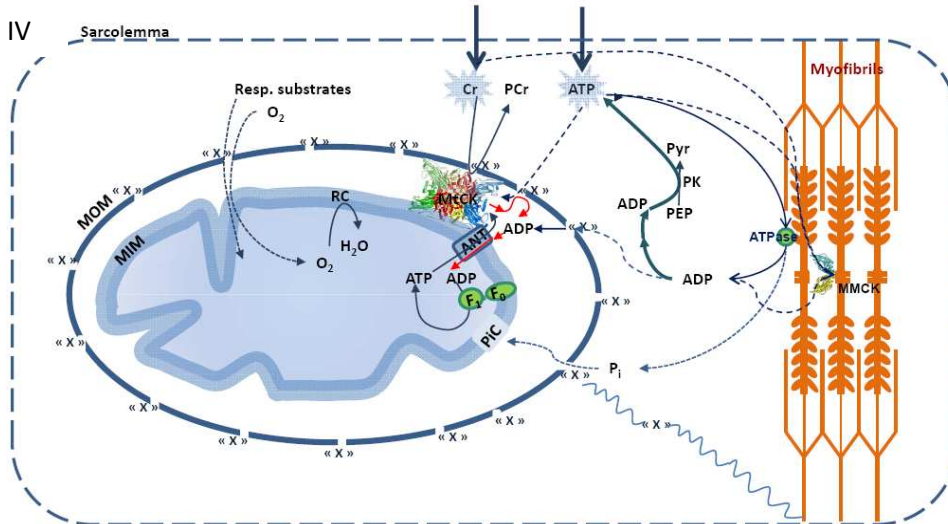


Figure 32A. Modèle expérimentale cardiomyocyte perméabilisé. La respiration mitochondriale est stimulée par la créatine en présence de l'ATP, glutamate, malate et le système piège pour l'ADP libre constitué du phosphoénolpyruvate (PEP) et pyruvate kinase (PK).

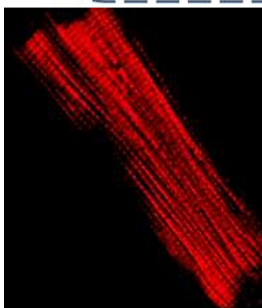


Figure 32B. Image en microscopie confocale des mitochondries dans le cardiomyocyte perméabilisé marqué avec le MitoTracker Red™ (0,2 µM)

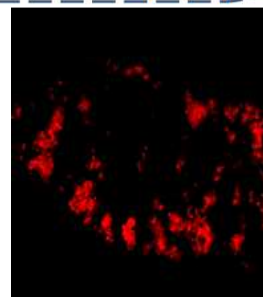


Figure 32C. L'image du même cardiomyocyte après 5 min d'incubation en présence de 0,2 µM trypsine

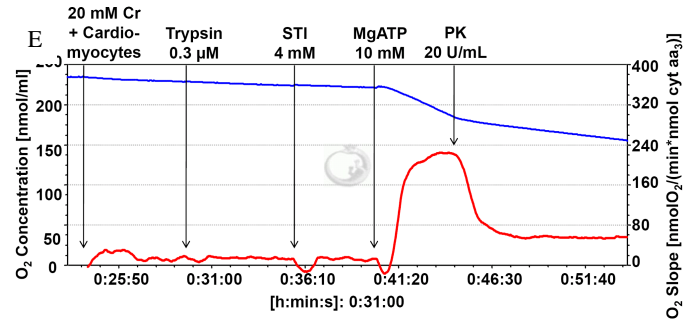
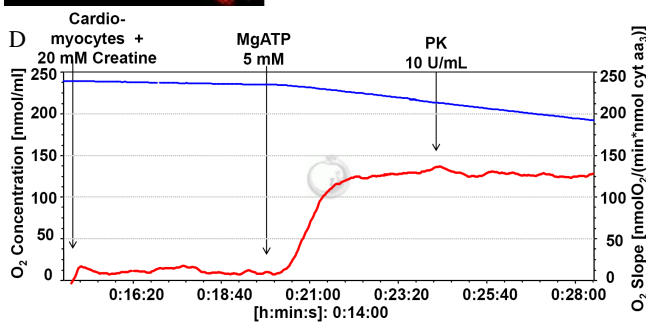


Figure 32D et E montre l'enregistrement oxygraphique de la respiration mitochondriale des cardiomyocytes perméabilisée stimulées par la créatine en présence de l'ATP. Le rajout du PEP et du PK ne change pas la respiration des cardiomyocytes perméabilisées (Figure 32D) et l'inhibe de manière importante après 5 min d'incubation en 0,2 µM trypsine (Figure 32E).

Nous avons donc validé les critères nécessaires (énumérés plus haut) pour l'étude des propriétés cinétiques de la MtCK *in situ* dans le modèle expérimental, les cardiomyocytes perméabilisés. Dans ce modèle, le système piégeant l'ADP (PEP-PK) mime les effets du système glycolytique : la consommation de l'ADP et la régénération de l'ATP endogène extra mitochondriale. La description schématique et le tracé oxygraphique de ce test sont donnés dans les figures 32A et 33A. La respiration est initialement stimulée par l'ADP endogène, issu de l'hydrolyse de l'ATP exogène puis le système PEP-PK est ajouté dans la chambre d'oxygraphie. Dans les conditions de la régénération de l'ATP extramitochondriale par le système PEP-PK, la créatine, rajoutée progressivement en concentrations croissantes, active la MtCK et stimule la respiration (Figures 32A et 33A). Ce protocole permet de relier la consommation de l'O₂ à la phosphorylation de l'ADP endogène, recyclé par la MtCK localement dans l'espace intermembranaire mitochondriale. Tenant compte du fait que la MtCK catalyse la réaction de deux substrats, ces propriétés cinétiques ont été étudiées en présence d'une concentration fixée d'un des substrats et de concentration variable de l'autre et vis versa (Figure 33B et 33C). Nous avons comparé les paramètres cinétiques de la MtCK *in situ* déterminés lors de nos expériences avec les constantes de dissociations de la MtCK *in vitro* publiées dans la littérature (Jacobus et Saks 1982). L'analyse des paramètres cinétiques de la MtCK *in situ* a mis en évidence une augmentation de 10 à 100 fois des constantes apparentes de dissociation de le MgATP du complexe binaire et tertiaire (1,94±0,86 mM et 2,04±0,14 mM pour le K_{ia}, et le K_a respectivement) par rapport aux valeurs caractéristiques pour les mitochondries isolées (0,44±0,08 mM et 0,016±0,01 mM respectivement) (Table 2 de la Figure 33). **La diminution de l'affinité de la MtCK *in situ* pour le MgATP exogène est due, probablement, à la restriction de la diffusion de l'ATP au niveau de la membrane mitochondriale externe dans la cellule perméabilisés.** Les constantes apparentes de dissociation de la créatine (K_{ib}, K_b) diminuent de 2 à 15 fois par rapport à la mitochondrie isolée (K_{ib} de 28±7 à 2,12±0,21 mM et K_b de 5±1,2 à 2,17±0,4 mM), traduisant une augmentation de l'affinité de la MtCK pour la créatine (Table 2 de la Figure 33). L'étude de l'affinité apparente de la MtCK pour la PCr a été réalisée en utilisant le même modèle présenté en figure 33A en présence de concentrations fixées en ATP et en créatine et des concentrations variables en PCr. L'affinité de la MtCK pour la PCr n'a pas changé dans les cellules cardiaques perméabilisées par rapport aux mitochondries isolées (K_{ip} est environ de 0,9 mM dans les deux cas) (Table 2 de la Figure 33). Ce résultat montre que **la PCr et la créatine circulent librement à travers la membrane mitochondriale externe de la mitochondrie *in situ* dans les cellules perméabilisées**, et que le flux énergétique d'une

cellule cardiaque est représenté par le flux de PCr plutôt que par le flux de l'ADP qui est limité au niveau de la membrane.

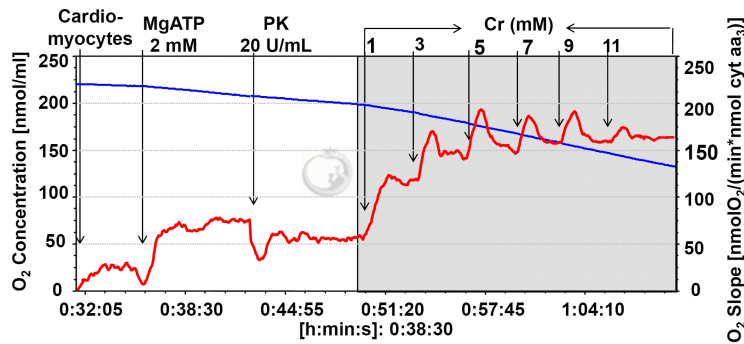
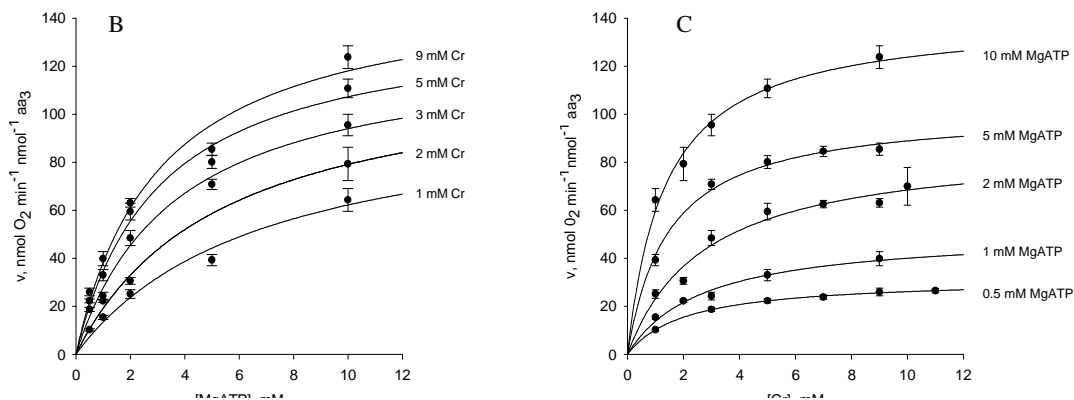


Figure 33A. Enregistrement oxygraphique du protocole expérimentale utilisé pour l'étude des propriétés cinétiques de la MtCK *in vivo* dans les cardiomyocytes perméabilisés. La respiration stimulée par la créatine a été calculée par soustraction du VO_{2PK} de la VO_{2Cr} ($VO_2 = VO_{2PK} - VO_{2Cr}$) pour éviter tout effet stimulateur résiduel de l'ADP extramitochondrial.



Figures 33B et C montrent la respiration des cardiomyocytes perméabilisés en présence (Figure 33B) de la concentration fixe de l'[ATP] et variable de la [Cr] et en présence (Figure 33C) de la concentration fixe de la [Cr] et variable de l'[ATP].

	K_{ia} MgATP (mM)	K_a MgATP (mM)	K_{ib} Cr (mM)	K_b Cr (mM)	K_{ip} (mM)
Mitoch. in vitro*	0.44 ± 0.08	0.016 ± 0.01	28 ± 7	5 ± 1.2	0.84 ± 0.22
Mitoch. in situ (with PEP-PK)	1.94 ± 0.86	2.04 ± 0.14	2.12 ± 0.21	2.17 ± 0.40	0.89 ± 0.17

Table 2. Constantes cinétiques apparentes de la MtCK cardiaque *in vitro* (mitochondrie isolée) et *in situ* (cardiomyocyte perméabilisé). (* - les constantes cinétique pour la Mitochondrie isolées ont été prises de Jacobus & Saks 1982, Monge et al., 2007)

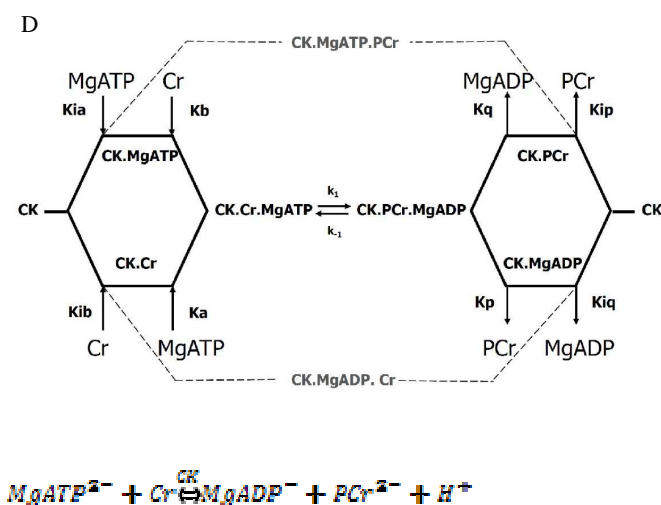
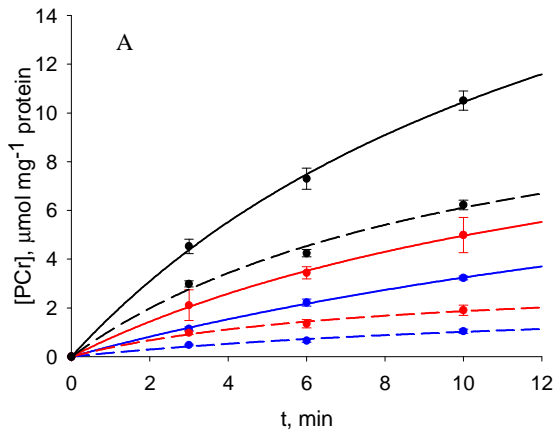


Figure 33D. Schéma de la réaction catalysée par la CK présentée en conformité avec la classification de Cleland, réaction aléatoire, de type Bi-Bi, en quasi équilibre. Les K_{ia} et K_a sont les constantes de dissociation du MgATP de ses complexes binaires et tertiaires (CK.MgATP et CK.Cr.MgATP respectivement). Les K_{ib} et K_b sont les constantes de dissociation de la créatine de ses complexes binaires et tertiaires (CK.Cr et CK.Cr.MgATP respectivement). La K_{ip} est la constante de dissociation de la PCr de son complexe binaire avec la CK (CK.PCr). Les k_1 et k_{-1} sont les constantes des vitesses de réactions directe et inverse. (Les complexes CK.MgATP.PCr et CK.Mg.ADP seront négligés dans notre travail car ils ont de très hautes constantes de dissociation. (Saks 1975).

Pour vérifier l'efficacité du contrôle de la respiration par la MtCK nous avons mesuré le contenu en PCr et la consommation en oxygène produits lors du même test utilisé pour l'étude cinétique (Figure 33A) le test est réalisé en présence de différentes concentrations fixées en MgATP (1, 2, 5 mM) et des concentrations croissantes en créatine (Figure 34). La réaction catalysée par la CK étant une réaction réversible, la PCr peut être produit par deux sources : intramitochondriale (MtCK) et extramitochondriale (MMCK). La production totale de la PCr est mesurée en présence de la phosphorylation oxydative activée par le glutamate et le malate. La production extramitochondriale de la PCr est mesurée en présence de la respiration mitochondriale inhibée (inhibition du complexe I par 10 mM roténone). La production mitochondriale (par la MtCK) de la PCr était calculée par soustraction du flux de PCr produit par les MMCK avec le flux de PCr totale: ($\text{flux}_{\text{PCr,MtCK}} = \text{flux}_{\text{PCr,-rot}} - \text{flux}_{\text{PCr,+rot}}$). Les échantillons collectés après 3, 6 et 10 min de stimulation de la respiration par la créatine. Sont analysés par HPLC/UPLC et les résultats nous ont permis d'estimer l'efficacité de la phosphorylation oxydative stimulée par la créatine en présence de l'ATP (le contrôle de la respiration par la MtCK). **Le Rapport PCr/O₂** (le flux de PCr mesuré en HPLC, la VO₂ mesurée par oxygraphie lors du même test) est **égal à 5,7±0,7**. Cette valeur est proche à la valeur théorique PCr/O₂=6 (elle signifie que pour synthétiser 3 moles d'ATP, la mitochondrie réduit 1 atome d'oxygène). Dans notre cas, l'ATP mitochondrial est transphosphorylé par la MtCK avec la production de la PCr qui sort librement dans le milieu. La concentration en MgATP, mesurée par HPLC, reste stable au cours du temps confirmant une forte restriction de sa diffusion au niveau de la membrane mitochondriale externe. Ces résultats confirment un phénomène bien connu, celui du couplage fonctionnel entre la MtCK et l'ANT grâce auquel est possible le cheminement directe de l'ATP de la matrice vers la MtCK.

Le premier objectif de cette étude est d'évaluer les flux de production de PCr par la créatine kinase mitochondriale et l'efficacité de la phosphorylation oxydative stimulée par l'ADP endogène produit localement par la MtCK. Le procédé (phosphorylation oxydative stimulée par la créatine et l'ATP en présence du système piège pour l'ADP, PEP-PK) et les méthodes (HPLC/UPLC et l'oxygraphie), utilisés pour mesurer le contenu en PCr dans des différents moments de la réaction et la respiration mitochondriale lors de la même réaction, correspond à ceux décrits dans la Figure 32A (schéma) et la Figure 33A, la seule différence étant que l'efficacité de production du PCr (PCr/O₂) de 5,68±0,14.



- [PCr] at 5 mM MgATP, - rotenone
- - - [PCr] at 5 mM MgATP, + rotenone
- [PCr] at 2 mM MgATP, - rotenone
- - - [PCr] at 2 mM MgATP, + rotenone
- [PCr] at 1 mM MgATP, - rotenone
- - - [PCr] at 1 mM MgATP, - rotenone

Figure 34A montre l'augmentation de la production de la PCr en fonction d'augmentation de la concentration du MgATP exogène.

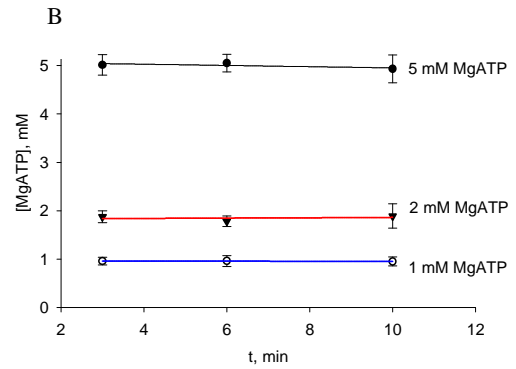


Figure 34B montre le niveau stable du MgATP régénéré de façon continu par le système PEP-PK

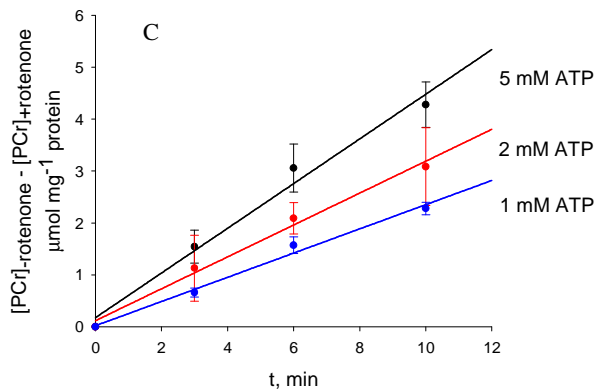


Figure 34C montre la différence le niveau de production de la PCr dans la réaction catalysée par MtCK en présence des différentes concentration fixes du MgATP. Ces valeurs sont calculées par soustraction du [PCr] produit par MtCK et MMCK du [PCr] produit uniquement par MMCK : $([PCr_{MtCK}] = [PCr_{-rot}] - [PCr_{+rot}])$.

	V_{PCr}	V_{O_2}	V_{PCr}/V_{O_2}
	$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$		
1 mM ATP	0.23 ± 0.02	0.041 ± 0.001	5.80 ± 0.45
2 mM ATP	0.31 ± 0.02	0.056 ± 0.02	5.44 ± 0.44
5 mM ATP	0.43 ± 0.04	0.074 ± 0.003	5.81 ± 0.48
	Average		5.68 ± 0.14

Table 3. Montre les flux de production de PCr par MtCK (mesurées en UPLC), les flux de consommations de l' O_2 (mesurés en oxygraphie) et leur rapport pour des différentes concentrations fixes du MgATP (les figures sont prises de Timohhina et al. 2009).

La diminution très importante de l'affinité apparente de la MtCK *in situ* pour le MgATP extramitochondrial en comparaison avec celle obtenue *in vitro*, la haute affinité pour la créatine et pour la PCr, associée à l'efficacité de production de la PCr proche de la valeur théorique indiquent l'existence d'une sélectivité de perméabilité de la membrane externe mitochondriale pour ces métabolites et, par conséquence son rôle dans le contrôle de la respiration mitochondriale *in situ*.

Un phénomène important a été observé lors de l'analyse des données de la cinétique MtCK *in situ* dans les modèles expérimentaux représentés dans les figures 31A et 32A. La cinétique de consommation de l'O₂ pour des concentrations identiques de l'ATP exogène est plus rapide dans les conditions de stimulation de la respiration à la fois par l'ADP endogène intramitochondriale, issue de la réaction de la MtCK, et par l'ADP endogène extramitochondriale, produit par les ATPases cellulaires (Figure 35, la courbe en ligne pleine sur le graphique). Dans ce cas, le K_m apparent pour l'ATP exogène (en présence de la créatine) est égale à 24.89±0.8 µM. Dans les conditions de la stimulation de la respiration mitochondriale *in situ* uniquement par l'ADP

endogène, issu de la réaction MtCK (en présence du système piège pour l'ADP extramitochondriale), le K_m apparent pour l'ATP exogène est environ 2 mM. **Cette différence des cinétiques révèle l'importance du signal de l'ADP cytosolique pour la stimulation de la respiration mitochondriale et de l'interaction de la phosphorylation oxydative avec le système glycolytique.** L'effet du rétrocontrôle de la respiration mitochondriale par à la fois l'ADP endogène extramitochondriale et par la créatine et le rôle de la MtCK comme amplificateur du signal ADP intracellulaire a été prédit mathématiquement par le modèle VAS

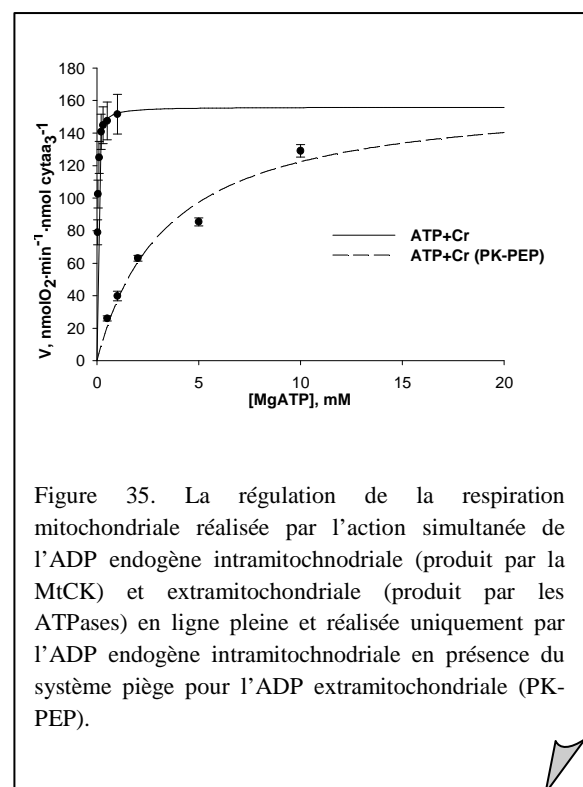


Figure 35. La régulation de la respiration mitochondriale réalisée par l'action simultanée de l'ADP endogène intramitochondriale (produit par la MtCK) et extramitochondriale (produit par les ATPases) en ligne pleine et réalisée uniquement par l'ADP endogène intramitochondriale en présence du système piège pour l'ADP extramitochondriale (PK-PEP).

(Aliev et Saks 1997, Saks et Aliev 1996, Vendelin et al. 2000). En conformité avec ce modèle et nos données expérimentales, **les fluctuations d'ADP, produites par l'hydrolyse de l'ATP, sont en partie traduites dans un signal métabolique de rétrocontrôle par les isoenzymes cytosoliques de la CK grâce à trois phénomènes : l'état stationnaire hors**

équilibre de la réaction des CK capable d'accepter des flux variables d'ADP, le mécanisme d'acheminement vectoriel du ligand de la navette CK/PCr et l'hétérogénéité du milieu intracellulaire.

3^{ème} étude expérimentale:

EFFET DE LA DOXORUBICINE SUR LA REGULATION DE LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE DANS LES FIBRES CARDIAQUES PERMEABILISEES (article 7).

Le cœur du rat Wistar est perfusé en présence ou en absence de 2 μM de doxorubicine (DOX) pendant 2 h puis les fibres musculaires sont prélevées du ventricule gauche après la perfusion, et perméabilisées à la saponine directement dans la chambre d'oxygraphe en présence de 2, 4, 8, 16, 32, 100, 200 et 500 μM DOX pendant 20 min à 25°C. La respiration basale (V_0) et stimulée par 2 mM ADP (V_{max}) est mesurée en présence soit de 5 mM glutamate et de 2 mM malate, soit de 50 μM palmytoil-L-carnitine et de 2 mM malate. Les consommations de l'oxygène (V_0 et V_{maxADP}) des fibres perméabilisées en provenance du cœur perfusé avec 2 μM de DOX et des fibres non perfusées avec la DOX mais pré-incubées avec 2 μM de DOX avant les mesures d'oxygraphie, étaient comparables (Table 4 de la Figure 36). La V_{max} des fibres incubées directement en présence des concentrations croissantes de DOX, diminue progressivement jusqu'à une valeur de 28,5% pour la dernière addition de DOX (500 μM) par rapport aux fibres non traitées (Figure 36A). L'étude de la cinétique de régulation de la respiration mitochondriale par l'ADP libre a révélé une différence non significative du K_m apparent pour les fibres non traitées et traitées avec 2, 4, 8, 16, 32 ou 100 et μM DOX, une tendance à la diminution du K_m^{app} pour les fibres traitées avec 200 μM DOX et une diminution significative du K_m apparent pour l'ADP libre en présence de 500 μM DOX ($180,9 \pm 26,6$ μM par rapport à $319,8 \pm 20,1$ μM pour les fibres non traitées, $p < 0,001$). Le K_m apparent pour l'ADP libre en présence de la créatine (autrement dit en présence de la MtCK activée) est de $17,7 \pm 6,3$ pour les fibres non traitées et de $128,5 \pm 24,3$ μM pour les fibres traitées avec 500 μM DOX ($p < 0,001$). Ces résultats montrent une augmentation de l'affinité de la phosphorylation oxydative pour l'ADP libre et un affaiblissement du couplage fonctionnel entre la MtCK et l'ANT. Afin d'évaluer l'effet de la DOX sur le couplage MtCK-ANT, l'affinité de la MtCK pour la créatine en fonction de différentes concentrations fixées en DOX a été déterminée. L'analyse montre que le K_m apparent pour la créatine dans le cœur perfusé est de $1,26 \pm 0,27$ mM. Ce paramètre augmente progressivement en fonction de la concentration en DOX jusqu'à $6,9 \pm 1,5$ mM pour les fibres incubées en présence de 200 μM DOX. La concentration suivante de 500 μM DOX a

provoqué la perte totale de l'effet stimulateur de la créatine sur la respiration mitochondriale (Figure 36).

Mean±SE	cœur perfuse		p	cœur perfuse		p
	+ 2 μM DOX			+ 2 μM DOX		
	5mM Gl+2mM Mal			0.05 Palm-Carn + 2 Mal		
V_0 (nmolO ₂ ·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ dwf)	3.66±0.76	4.0±0.52	0,74	2.89±0.66	2.08±0.69	0,79
V_{max} 2 mM ADP (nmolO ₂ ·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ dwf)	23.0±3.59	17.67±3.62	0,39	9.61±3.3	6.38±0.83	0,61
ACR	6.3±2.17	3.67±0.76		3.34±0.7	3.3±0.7	

Table 4. Les paramètres de la respiration mitochondriale des fibres cardiaques perméabilisées

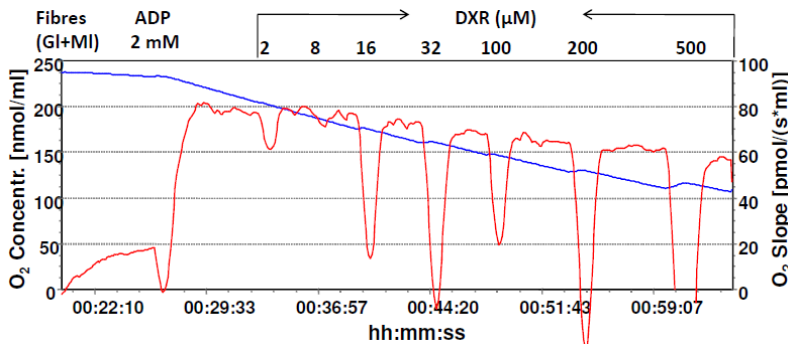


Figure 36A. Enregistrement oxygraphique de la consommation de l'O₂ des fibres cardiaques perméabilisées en fonctions de différentes concentrations de Doxorubicin.

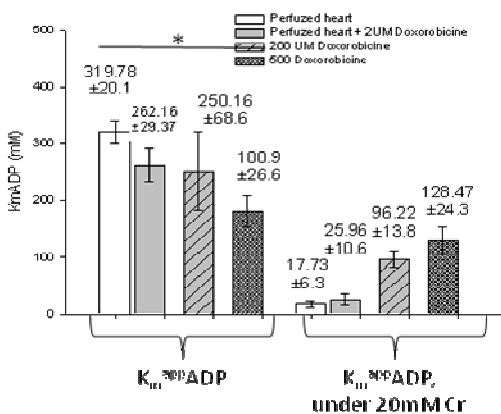


Figure 36B. Diagramme représentant le Km apparent pour l'ADP libre (-/+ 20 mM créatine) des fibres cardiaques perméabilisées, traitées par différentes concentrations de Doxorubicin

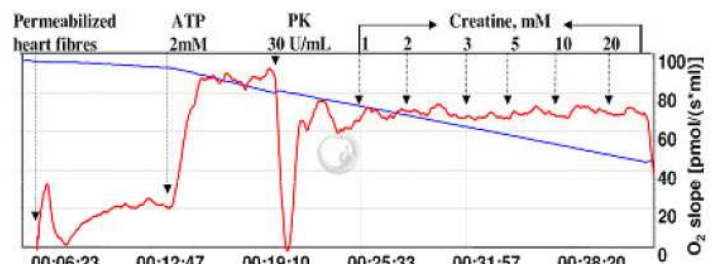
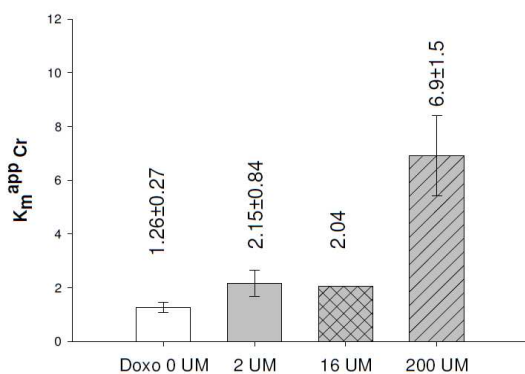


Figure 36C montre le diagramme représentant l'affinité de la MtCK pour la créatine dans les fibres cardiaques perméabilisées en présence de différentes concentrations de DOX

Figure 36D. Le tracé d'oxygraphie sur lequel on voit l'absence de stimulation de la respiration mitochondriale par la créatine

4^{ème} étude expérimentale:

LA BIOENERGETIQUE DE LA DYSFONCTION MUSCULAIRE ET LES EFFETS DE L'ENTRAÎNEMENT EN ENDURANCE DES MALADES ATTEINTS DE BRONCHOPNEUMOPATHIE OCHRONIQUE OBSTRUCTIVE (article 8).

La dysfonction musculaire des patients atteints de broncho-pneumopathie obstructive chronique

La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes et du parenchyme pulmonaire définie par l'installation progressive d'un trouble ventilatoire obstructif. Etant en progression constante, la maladie sera la troisième cause de décès d'ici 2020 (Lopez et al. 2006a, Lopez et al. 2006b).

En dehors des conséquences pulmonaires, la BPCO est également associée à des effets systémiques comme par exemple à la dysfonction musculaire, à la malnutrition, à la perte de poids corporel (Agusti et al. 2003, Wong et al. 2008). L'étiologie du dysfonctionnement musculaire squelettique chez les patients atteints de BPCO est multifactoriel et inclut la limitation de l'activité physique due à la dyspnée progressive, au mode de vie sédentaire, à l'hypoxie tissulaire, à l'inflammation systémique, au dommage oxydatif et à la dénutrition (Agusti 2008, Agusti et al. 2004, Agusti et al. 2002, Broekhuizen et al. 2006, Li et al. 1998, Yende et al. 2006). Le dysfonctionnement ou la faiblesse musculaire squelettique sont caractérisés par des changements fonctionnels (diminution de la force et de l'endurance) et anatomiques et contribue de manière significative à la limitation de la capacité d'exercice et de la qualité de vie (Agusti 2008, 2003).

Plusieurs études ont montré que chez les patients atteints de BPCO, il y a une diminution du pourcentage des fibres de type I et une augmentation du pourcentage des fibres de type IIx, (Gosker et al. 2002a, Gosker et al. 2002b, Jakobsson et al. 1990, Maltais et al. 1999, Satta et al. 1997, Whittom et al. 1998,) Des fibres de type intermédiaires I-IIx ont été également observés. Ce changement de type des fibres est accompagné par l'augmentation de la capacité glycolytiques des fibres (lactate déshydrogénase, hexokinase, phosphofruktokinase) et la diminution de l'activité des enzymes oxydatives (citrate synthétase, des enzymes du cycle de Krebs, de 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HADH, enzyme de la β -oxydation des

acides gras) (Gosker et al. 2000, Maltais et al. 1996). Ces modifications reflètent la capacité aérobie réduite résultant du rephosphorylation inefficace de l'ATP (Pouw et al. 1998). Les rapports Pi/PCr et d'ADP/ATP sont élevés et associés à l'augmentation légère de l'inosine monophosphate (IMP) due probablement à la dégradation augmentée de l'AMP par la désamination. Plusieurs études utilisant la technique de spectroscopie du ^{31}P par résonance magnétique nucléaire (^{31}P RMN) réalisée chez les patients atteints de BPCO, on mis en évidence la diminution de la capacité oxydative des muscles squelettiques induits par l'exercice et caractérisée par l'épuisement rapide et la régénération lente de la PCr, l'augmentation du taux Pi/PCr, la diminution du pH intracellulaire et même la diminution de l'ATP et de la créatine (Kutsuzawa et al. 1995 Wuyam et al. 1992). L'estimation de la cinétique de régénération de la PCr après l'exercice est le paramètre le plus informatif de l'étude de la phosphorylation oxydative dans le muscle squelettique (Pipinos et al. 2000, Weiss et al. 2005). L'analyse cinétique de la réaction de la CK *in vivo* en utilisant la spectroscopie du ^{31}P RMN, peut donner l'estimation des flux de la réaction, de la variation d'énergie libre d'hydrolyse de l'ATP, l'efficacité et les réserves de la réaction CK (le rapport entre le flux de la réaction CK et la phosphorylation oxydative, (Greiner et al. 2007, Neubauer 2007, Ten Hove et Neubauer 2007, Weiss et al. 2005).

L'adaptation métabolique du muscle squelettique à l'exercice

La capacité aérobie des muscles (l'activité de la citrate synthase (CS), de la succinate déshydrogénase (SDH), et du cytochrome oxydase (COX)) est en corrélation directe avec le niveau de l'activité physique spontanée journalière (Den Hoed et al. 2008). La réponse du muscle à l'entraînement dépend de la nature du stimulus adaptatif. L'exercice en résistance a comme conséquence l'hypertrophie des cellules musculaires avec une augmentation de la force, sans changements importants biochimiques. L'exercice en endurance induit une augmentation de la capacité du métabolisme aérobie par l'intermédiaire de l'augmentation du nombre des mitochondries, sans hypertrophie du muscle ni d'augmentation de la force musculaire (Holloszy 2008). Cette augmentation du nombre de mitochondries explique l'amélioration de la cinétique d'extraction de l'oxygène en présence d'un apport du sang et de l'oxygène comparable entre le muscle entraîné et non entraîné. (Hochachka 2003, Holloszy 2008). Le quotient respiratoire (QR) devient plus bas (0,81) chez les sujets entraînés par rapport aux non entraînés, indiquant un décalage vers la combustion des acides gras. Ce décalage se manifeste par l'augmentation de la prise et du transport intracellulaire des AG,

l'augmentation de l'activité des enzymes de β -oxydation des acides gras, du cycle de Krebs (citrate synthase, aconitase, NAD-spécifique isocitrate déshydrogénase, succinate déshydrogénase, α -glutarate déshydrogénase, malate déshydrogénase), des enzymes de la navette malate-aspartate mitochondriale et de la chaîne respiratoire mitochondriale ayant pour résultat l'augmentation de la synthèse de l'ATP via la phosphorylation (Alsted et al. 2009, Hochachka 2003, Holloszy et Booth 1976, Hood 2001, Howald et al. 1985, Hwang et al. 2001, Kiens et al. 1993). Ces modifications touchent non seulement les muscles oxydatifs, mais également les muscles glycolytiques. Le marquage de l'homogénat du muscle gastrocnémien par [^{14}C]palmitoyl-CoA, permettant la mesure de la production du $^{14}\text{CO}_2$, montre que l'entraînement en endurance (80-115 km·semaine⁻¹ – 10 semaines) augmente 7 fois la capacité de β -oxydation des acides gras (Costill et al. 1979). En étudiant l'activité des isoenzymes de la CK dans les biopsies du muscle soléaire et gastrocnémien des coureurs, l'entraînement marathonien de 9 semaines induit une augmentation de l'activité de la MtCK en approchant le pattern du muscle soléaire du modèle de muscle cardiaque (Apple et Rogers 1986), et une augmentation de l'expression de la MbCK dans le muscle gastrocnémien suite probablement à l'endommagement musculaire induit par stress répétitif (car la MbCK est caractéristique plutôt pour la formation embryonnaire du muscle squelettique) (Apple et al. 1985). Plusieurs auteurs ont montré que l'exercice en endurance augmente la sensibilité de la respiration mitochondriale à la créatine : l'augmentation du $V_{\text{Cr}}/V_{\text{ADP}}$ (Walsh et al. 2001, Walsh et al. 2006) ou la diminution du $K_m^{\text{app}} \text{ADP}$ en présence de la créatine dans les muscles squelettique du rat (soléaire, plantaire, gastrocnémien) (Zoll et al. 2002), dans les muscles gastrocnémien et le vaste latérale externe des athlètes (Ponsot et al. 2006, Zoll et al. 2006), des insuffisants cardiaques (Zoll et al. 2003), des patients atteints de BPCO (Guerrero et al. 2005) ou atteints d'ostéo-arthrite (Eimre et al. 2006). Une des adaptations la plus typique du muscle squelettique à l'entraînement est l'ajustement entre l'utilisation et la production de l'ATP : l'augmentation moins importante de la concentration de l'ADP, AMP, IMP, créatine et Pi et une diminution moins importante de la PCr au cours du travail. Cet ajustement est accompagné par une stimulation moins importante de la glycolyse, résultant de la diminution de la production et d'un meilleur couplage entre l'oxydation du pyruvate et le flux glycolytique (Hochachka 2003).

L'objectif de cette étude est d'appliquer les méthodes d'investigations, utilisées précédemment chez le rat, à l'étude de la régulation de la respiration mitochondriale des muscles squelettiques des patients atteints de BPCO, avant et après l'entraînement en endurance ; ceci afin de vérifier si cet entraînement augmente la capacité oxydative des

muscles squelettiques, en influençant les mécanismes de régulation de la respiration mitochondriale et en augmentant le rôle du contrôle métabolique par la MtCK.

Résultats

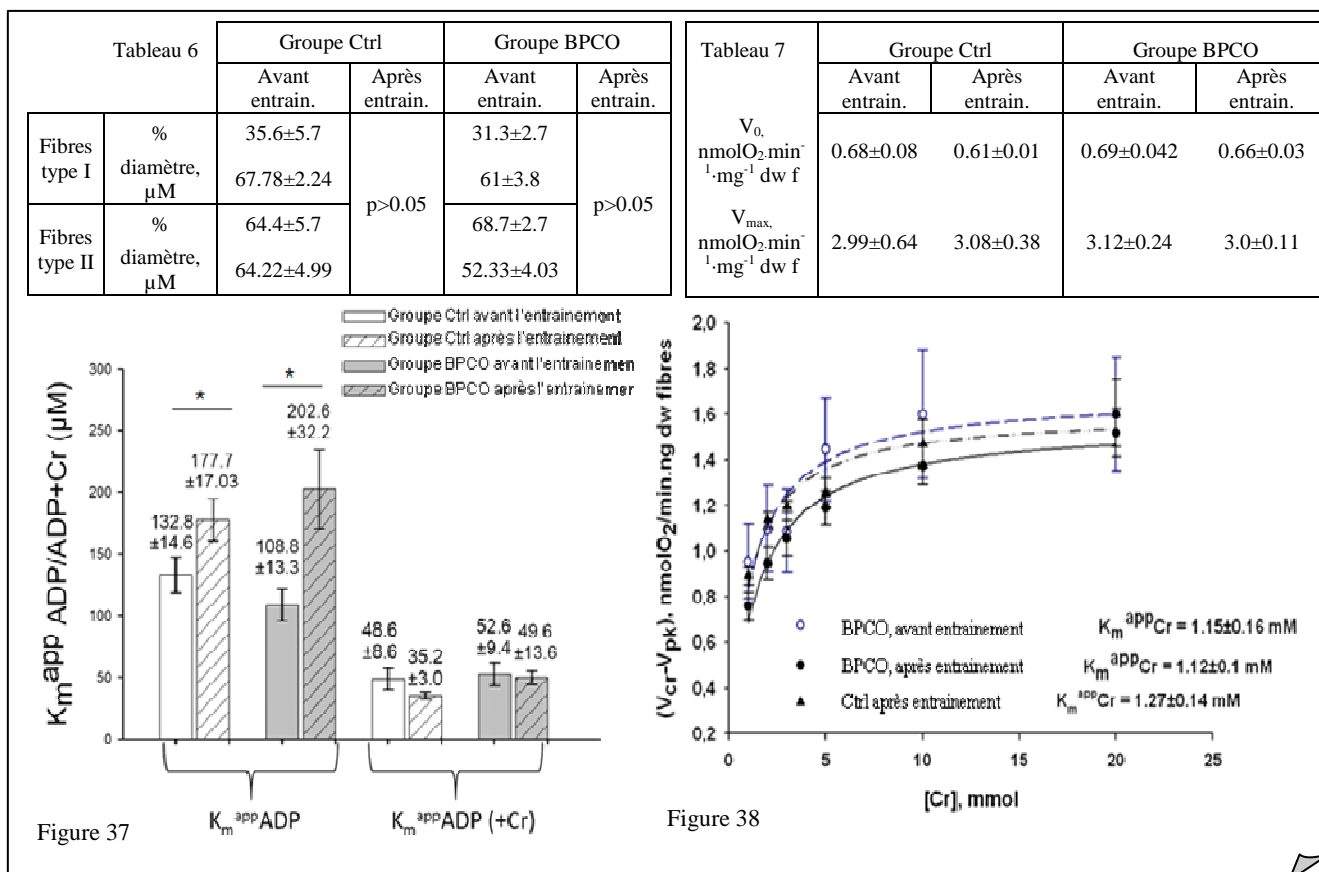
Deux groupes ont été inclus dans l'étude (Table 5): le groupe « BPCO », formé de 9 patients atteints de BPCO stade II, III en conformité avec la classification GOLD (GOLD - Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease ; le critère principal est le volume d'expiration maximale en une seconde qui doit être compris entre 30% et 80%, avec un rapport VEMS/CVF<70%) et le groupe contrôle « Ctrl », formé de 9 volontaires sains de même âge, sexe et avec un niveau comparable d'activités physiques (estimé en utilisant le questionnaire proposé par Voorrips pour les sujets sédentaires et les patients atteints BPCO) (Voorrips et al. 1991).

Table 5	Ctrl		BPCO	
	Avant entrain.	Après entrain.	Avant entrain.	Après entrain.
Age, années	59,8±3,5		62,3±3,8	
Taille (m)	1,72±0,02		1,7±0,02	
Poids (kg)	75,9±1,60	p>0,05	67,5±3,7	p>0,05
VEMS ₁ , %	105,7±4,4	p>0,05	48,3±4,9**	p>0,05
VO _{2max} , mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹ _{poids corps}	31,05±1,6	32,8±1,5	16,04±0,9**	19,03±1,01 [†]
Indexe masse corps, kg·m ⁻²	25,7±0,4	25,5±0,5	23,3±1,2	23,2±1,3

Les participants à l'étude ne correspondent pas aux critères de sédentarité conformément au questionnaire Voorrips (indexe < 9), mais, néanmoins, leur niveau d'activité physique est comparable (16,2 ± 3,2 dans le groupe BPCO et 17,5 ± 1,4 dans le groupe contrôle). Les patients reçoivent le traitement de fond constitué de β-agonistes, de anti-cholinergiques de longue durée d'action et des corticostéroïdes inhalés.

Le schéma expérimental comprend l'évaluation initiale et finale (fonctions cardio-respiratoires, aptitude à l'exercice, biopsies) et un entraînement en endurance sur véloergomètre pendant 3 mois (12 séances par 45 min chaque suivant le programme individualisé) à domicile, donc dépendent de l'assiduité des participants. L'aptitude à l'exercice était réalisée lors d'un exercice incrémental sur cycloergomètre avant et après l'entraînement. Deux biopsies du muscle vaste latéral externe ont été effectuées : une avant et une après l'entraînement (Bergström 1962).

Même si le niveau de l'activité physique des participants à l'étude était comparable, la consommation en oxygène lors du test incrémentale avant l'entraînement (Tableau 5) était deux fois plus important chez les sujets sédentaires et augmente significativement après l'entraînement dans le groupe BPCO (de $16,04 \pm 0,9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}$ à $19,03 \pm 1,01 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}$, $p < 0,05$).



La morphométrie et l'histochimie des fibres musculaires des patients et des volontaires sains révèlent une prévalence des fibres de type II (environ 64,4-68,7% du nombre total des fibres) dans les deux groupes, sans une différence significative en diamètre des fibres (mesurés en utilisant la microscopie électronique et la technique de mesure de l'activité de la myosine ATPase selon Mabuchi et Sreter 1980a, 1980b). Aucun changement de type de fibres n'est observé après 3 mois d'entraînement (Tableau 6).

La respiration basale (V_0) des fibres perméabilisées (en présence de 5 mM glutamate et 2 mM malate) est identique dans les deux groupes avant la réhabilitation et n'a pas changé après l'entraînement (Tableau 7). De plus, la cinétique de l'ADP exogène, en absence et en présence de créatine, a été étudiée (Figure 37). Le K_m^{app} pour l'ADP libre est comparable dans les deux groupes avant l'entraînement ($132,8 \pm 14,6 \mu\text{M}$ et $108,8 \pm 13,3 \mu\text{M}$ pour le groupe

BPCO et le groupe contrôle respectivement, $p > 0,05$), ces valeurs reflétant un comportement et une composition du tissu musculaire plutôt glycolytiques. Après l'entraînement, on observe une augmentation significative du K_m^{app} pour l'ADP libre dans les deux groupes (jusqu'à $202,6 \pm 32,2 \mu\text{M}$ chez les BPCO et $177,7 \pm 17,03 \mu\text{M}$ chez les volontaires sains).

Etant donnée le rôle de la MtCK dans la régulation de la respiration mitochondriale des cellules musculaires, la mesure de la cinétique de l'ADP en présence de la MtCK activée (ou en présence de la créatine) a été réalisée (Figure 37). Dans les deux groupes, une diminution du K_m^{app} pour l'ADP libre en présence de la créatine ($K_m^{app}_{ADP (+Cr)}$) a été observée par rapport au K_m apparent sans créatine ($K_m^{app}_{ADP}$). Cet effet, préservé après l'entraînement, a induit une modification du rapport $K_m^{app}_{ADP} / K_m^{app}_{ADP (+Cr)}$ (augmentation d'un facteur 2).

En présence de la créatine ajoutée au milieu et de l'ATP, la MtCK recyclé localement de l'ADP endogène activant préférentiellement la respiration par rapport à l'ADP exogène. Cette augmentation de l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP endogène est visualisée par la diminution du $K_m^{app}_{ADP}$ en présence de la Cr.

Nous avons, également tester l'affinité de la MtCK pour la créatine (Figure 38). Pour ce faire, nous avons appliqué le protocole d'évaluation des propriétés cinétiques de la MtCK *in situ* élaboré lors de la deuxième étude sur le Rat. L'affinité de la MtCK pour la créatine est comparable dans les deux groupes et n'a pas changé significativement après l'entraînement ($K_m^{app}_{Cr}$ a changé de $1,55 \pm 0,16$ à $1,12 \pm 0,1$ mM dans le groupe BPCO et de $1,28 \pm 0,7$ à $1,27 \pm 0,14$ mM dans le groupe contrôle).

DISCUSSION

Les théories conflictuelles de la régulation de la respiration mitochondriale

Dès le début, la découverte du contrôle métabolique de la respiration mitochondriale par la créatine est liée à la découverte de la phosphorylation oxydative par Engelhardt. Engelhardt montre que la consommation de l'oxygène est couplée à la synthèse de l'ATP (Engelhardt 1982). Ensuite, Belitzer et Tsybakova prouvent que la consommation de l'oxygène est également liée à la production de PCr. L'efficacité de cette production, mesurée par Belitzer (1930) dans l'homogénat du muscle pectorale du pigeon en présence de la créatine (PCr/O₂), était de 5,2-7 (Belitzer et Tsybakova 1939). Plus tard, dans les années 1975-1987, des études prouvent que la haute efficacité du contrôle de la phosphorylation oxydative par la créatine est due au couplage fonctionnel de la MtCK avec l'ANT (Dolder et al. 2003, Saks et al. 2008, Saks et al. 2007a, Saks et al. 2004, Schlattner et Wallimann 2004, Vendelin et al. 2004b, Wallimann et al. 1992, Wallimann et al. 2007, Wyss et al. 1992). Bien que, des énormes progrès dans l'étude de la bioénergétique des mitochondries isolées sont réalisés (Nicholls et Ferguson 2002), la nature du contrôle respiratoire, les mécanismes de la régulation des flux énergétiques dans les cellules cardiaques *in vivo* restent encore des sujets de débats. Comme il a été mentionné en introduction, trois théories ont été proposées au cours de l'histoire de la recherche, dans le domaine du métabolisme énergétique, mais le problème est loin d'être résolu.

Une des plus anciennes est la théorie de régulation de la respiration *in vivo* par l'ADP, estimée à partir de l'équation à l'équilibre de la CK. Cette théorie suppose que l'ADP diffuse librement dans le milieu homogène intracellulaire (*in vivo* comme *in vitro*) (Beard 2005, 2006, Kushmerick et Conley 2002, Meyer et al. 1984). Récemment, Wu et al. ont calculé (en se basant sur la réaction de la CK comme étant une réaction à l'état d'équilibre) le changement de l'énergie libre d'hydrolyse de l'ATP afin de prédire le comportement du système (Wu et Beard 2009, Wu et al. 2009, Wu et al. 2008). Néanmoins, l'argument qui contredit la théorie d'équilibre de la réaction de la CK reste toujours incontesté – c'est le phénomène de la stabilité métabolique de la cellule cardiaque (l'augmentation linéaire de consommation de l'oxygène et de l'ATP en fonction du travail cardiaque en présence d'une stabilité de la concentration en PCr et en ATP intracellulaire) (Balaban et al. 1986, Dos Santos et al. 2000, Griffiths et Rutter 2009, Weiss et al. 2005, Williamson et al. 1976).

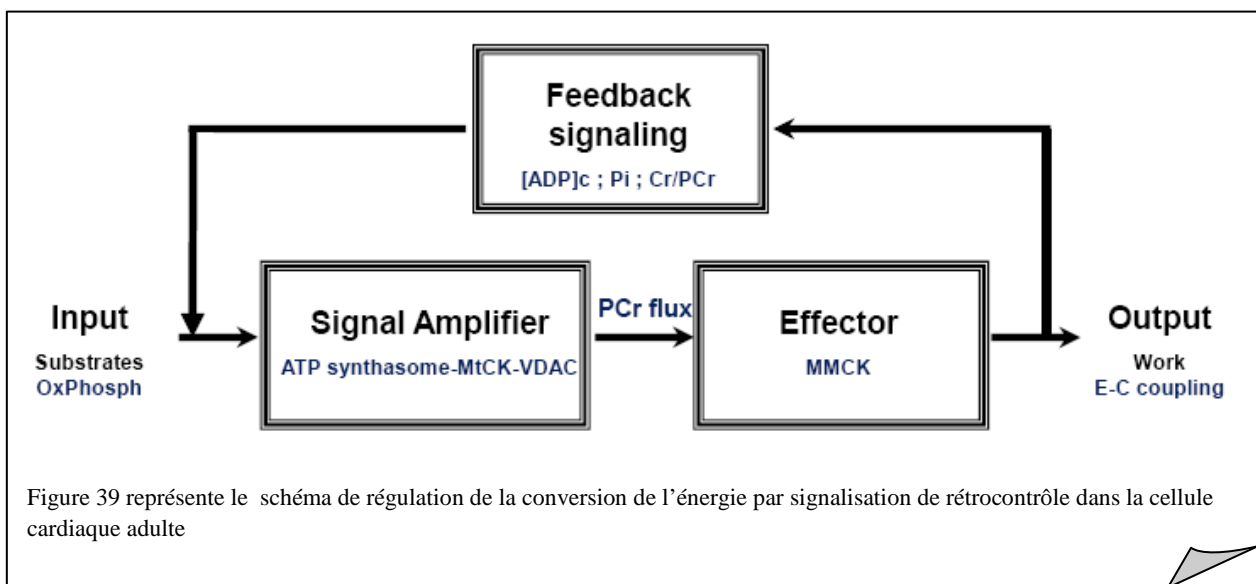
Afin d'expliquer la régulation de la respiration mitochondriale dans les conditions de la stabilité métabolique, une deuxième théorie, celle de l'activation parallèle par le Ca²⁺ a été

proposée (Balaban 2002, 2009, Dedkova et Blatter 2008, Hom et Sheu 2009). Toutefois, cette théorie de l'activation « uniquement par le Ca^{2+} » ne répond toujours pas au critère du signal de coordination du métabolisme énergétique des cardiomyocytes en fonction du travail, formulé récemment par O'Rourke (Liu et O'rourke 2009). Conformément à ce critère, les variations de la concentration cytoplasmique en Ca^{2+} doivent correspondre à la charge de travail et à la consommation de l'ATP (Liu et O'rourke 2009). Toutefois, l'activation longueur-dépendante du sarcomère (Frank-Starling) est caractérisée par l'augmentation de la sensibilité au calcium et de l'activité ATPasique sans être accompagnée par des modifications de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} (Shimizu et al. 2002).

Ces deux théories sont basées sur les données expérimentales recueillies *in vitro* ou issues de la modélisation mathématique qui supposent que le milieu intracellulaire est homogène (Balaban 2009, Wu et Beard 2009, Wu et al. 2009, Wu et al. 2008). Notre étude expérimentale montre que les mécanismes de régulation de la respiration mitochondriale sont dépendants du niveau du système, et c'est pour cela que leur analyse demande une approche systémique prenant en considération les interactions structurales et fonctionnelles entre les différentes composantes du système. Nous soutenons cette troisième théorie de la régulation du métabolisme énergétique *in vivo* favorisant le transfert de l'énergie et la signalisation par rétrocontrôle via le circuit de transfert des groupements Pi (navette PCr/CK) (Dos Santos et al. 2000, Dzeja et Terzic 2003, Saks et al. 1994, Wallimann et al. 1992). Le schéma de la figure 39 montre le principe général de la régulation par le rétrocontrôle, proposée par Norbert Wiener en 1947 (Wiener 1965), adapté pour les mécanismes de régulation de la respiration dans les cardiomyocytes induits par le travail. Dans ce schéma, l'utilisation de l'ATP (ou la libération de l'énergie libre d'hydrolyse de l'ATP (ΔGATP) pour réaliser un travail, qui correspond, dans la figure 39, à la sortie) et sa régénération (ou l'extraction de l'énergie libre de phosphorylation de l'ATP (i.e. de l'hydrolyse) des substrats par la phosphorylation oxydative, qui correspond, dans la figure 39, à l'entrée) sont interconnectés par l'intermédiaire de la signalisation de rétrocontrôle métabolique par l'ADP cytosolique, le Pi et la créatine. Dans ce cas, tout l'ATP mitochondrial est utilisé pour la synthèse de PCr par la MtCK qui est à son tour, utilisée pour la régénération de l'ATP local myofibrillaire par la MMCK. Ces deux CK participent au transfert d'énergie en catalysant leurs réactions hors de l'état d'équilibre, dans deux directions opposées (sens direct pour la MtCK, et sens inverse pour la MMCK) dépendantes de leur environnement (i.e. propriétés au niveau du système). A cause de cela, elles possèdent deux importantes propriétés :

- les MMCK et les ATPases génèrent des signaux métaboliques (ADP, Cr et Pi) lors du travail cardiaque cyclique) et
- les MtCK fonctionnent comme un amplificateur de ce signal via le couplage fonctionnel formé de l'ATP-synthasome, de la MtCK-ANT et du VDAC.

Le principe de rétrocontrôle de la régulation de la respiration est la condition assurant la stabilité métabolique nécessaire pour le travail d'un cœur normal. Les signaux métaboliques énergétiques sont si complexes que leur compréhension en intégralité dépasse les possibilités et les outils de la biologie analytique.



Afin de comprendre les mécanismes intracellulaires de cette régulation, le concept présenté schématiquement ci-dessus est basée sur les résultats expérimentaux obtenus lors de notre travail basé sur **l'étude de la régulation de la respiration mitochondriale dans les cellules musculaires menée.**

Dépendance structure/fonction. Intétractosome

Les études comparatives de la cinétique de régulation de la respiration mitochondriale et de l'organisation intracellulaire des mitochondries dans les cellules HL-1 NB et les cardiomyocytes adultes montrent que **les mécanismes de régulation du métabolisme énergétique dépendent du niveau d'organisation cellulaire** (Anmann et al. 2006, Beraud et al. 2009, Monge et al. 2009).

Dans les cellules HL-1 NB, possédant un **réseau irrégulier des mitochondries** qui sont en mouvement continu **avec des phénomènes de fusion et de fission** (Beraud et al. 2009, Pelloux et al. 2006), le métabolisme énergétique est **caractérisé par** une diminution de

la restriction à la diffusion de l'ADP libre, associée à **une augmentation de l'affinité de la phosphorylation oxydative pour l'ADP libre** ($K_m^{\text{app}}\text{ADP} = 25 \pm 4 \mu\text{M}$), à **une perte du contrôle métabolique par la créatine** et, par conséquence, à la perte du transfert dirigé du flux d'énergie. Ces propriétés sont semblables à celles des mitochondries isolées, dans un milieu homogène. Récemment, il a été montré que les cellules HL-1 NB ont un profil métabolique glycolytique caractérisé par une basse activité de la créatine kinase totale et une haute activité de l'hexokinase II (Monge et al. 2009).

En revanche, **dans les cardiomyocytes adultes, caractérisés par un réseau mitochondrial hautement structuré** grâce aux interactions entre les mitochondries et les éléments du cytosquelette (Beraud et al. 2009, Vendelin et al. 2005), **une restriction de diffusion de l'ADP libre au niveau de la membrane mitochondriale externe** ($K_m^{\text{app}}\text{ADP} \sim 300 \mu\text{M}$) **est associée à une très haute affinité apparente de la MtCK pour la créatine** ($K_m^{\text{app}}\text{Cr} = 2,5 \text{ mM}$).

En étudiant expérimentalement les propriétés cinétiques de la MtCK des mitochondries cardiaques isolées et en les modélisant mathématiquement pour les cellules vivantes (Jacobus et Lehninger 1973, Saks et al. 1974, Saks et al. 1975, Vendelin et al. 2004a) montrent que ces propriétés sont dépendentes du couplage fonctionnel de la MtCK avec la phosphorylation oxydative via l'ANT (Gellerich et Saks 1982). La constante apparente de dissociation de l'ATP du complexe tertiaire avec la MtCK diminue 10 fois en présence de la phosphorylation oxydative activée (Jacobus et Saks 1982). Cette forte affinité de la MtCK pour l'ATP disparaît quand la MtCK est détachée de la surface membranaire mitochondriale (Kuznetsov et al. 1989). Gellerich (1987), a proposé l'hypothèse de la compartimentation dynamique de l'ADP, ceci est en accord avec la perméabilité de la membrane externe mitochondriale qui influence l'efficacité du couplage fonctionnel MtCK-ANT et, par conséquence, la régulation de la respiration mitochondriale. Par analyse mathématique, Vendelin a montré que les données cinétiques obtenues pour les mitochondries *in vitro* sont expliquées par l'acheminement direct de l'ATP de l'ANT vers la MtCK. Dans cette étude, nous avons trouvé que le rôle de la membrane externe mitochondriale, dans la compartimentation de l'ADP et le couplage fonctionnel MtCK-ANT, est beaucoup plus important *in vivo* qu'*in vitro*.

Le modèle expérimentale des mitochondries *in situ*, dans les cardiomyocytes perméabilisés, intégrées structurellement (via les interconnexions avec les éléments du cytosquelette) et fonctionnellement (via le système PEP-PK qui imite la glycolyse) permet d'étudier les propriétés cinétiques de la MtCK *in situ* et le rôle de la membrane

mitochondriale externe dans la régulation de la respiration mitochondriale. L'affinité apparente de la MtCK *in situ* pour la créatine augmente de 2 à 15 fois (K_{ib} de $2,12 \pm 0,21$ mM et K_b de $2,17 \pm 0,40$ mM) par rapport aux mitochondries isolées (28 ± 7 mM et $5 \pm 1,2$ mM pour la K_{ib} et la K_b respectivement) (Guzun et al. 2009, Jacobus et Saks 1982, Monge et al. 2008). Mais quel est le facteur qui influence l'augmentation de l'affinité de la MtCK pour la créatine *in situ* par rapport à *in vitro* et quelle est la nature du signal qui pourrait influencer la vitesse de la réaction directe de la MtCK (de production de la PCr), sachant que c'est une réaction hors de l'état d'équilibre ?

Afin de répondre à la première partie de la question, nous avons estimé les constantes apparentes de dissociation *in situ* du deuxième substrat de la MtCK, d'ATP. L'affinité apparente de la MtCK *in situ* pour l'ATP exogène diminue de 10 à 100 fois (K_{ia} de $1,94 \pm 0,86$ mM et K_a de $2,04 \pm 0,14$ mM) par rapport aux mitochondries *in vitro* ($0,44 \pm 0,08$ mM et $0,016 \pm 0,01$ mM pour la K_{ia} et la K_a respectivement) (Guzun et al. 2009, Jacobus et Saks 1982, Monge et al. 2008), témoignant d'une haute restriction à la diffusion de l'ATP exogène au niveau de la membrane mitochondriale externe.

Récemment, Hornikova et al ont montré que la fixation de la MMCK à la myofibrille influence la conformation active de la MMCK en augmentant son affinité pour les substrats (Hornikova et al. 2009). L'ATP mitochondrial, grâce au couplage fonctionnel entre la MtCK et l'ANT et à la restriction de la diffusion au niveau de la membrane mitochondriale externe, pourraient, de même, influencer la conformation active de la MtCK en augmentant l'affinité pour la créatine (Gellerich et al. 1987, Gellerich et al. 2000, Vendelin et al. 2004a).

Nous avons également testé la sélectivité de la membrane externe pour l'ADP. Le système piège pour l'ADP libre (PEP-PK) n'inhibe pas la respiration contrôlée par la MtCK dans les cardiomyocytes perméabilisés. Les constantes apparentes de dissociation de la PCr sont comparables pour les mitochondries isolées et pour les cardiomyocytes perméabilisés (K_{ip} de $0,89 \pm 0,17$ mM). **La membrane externe mitochondriale *in situ* présente une haute sélectivité de perméabilité avec la restriction à la diffusion de l'ATP et la libre circulation de la PCr et la créatine.** Cette restriction n'existe ni dans les mitochondries isolées ni dans les cellules traitées par la trypsine (Kuznetsov et al. 1996). Les travaux expérimentaux utilisant l'électrophysiologie, l'oxygraphie, la microscopie réalisés et publiés par Rostovtseva, Saks et Monge, montrent que la sélectivité de la perméabilité de la membrane mitochondriale externe peut être due à la modification de la perméabilité de VDAC, induite par la fixation des protéines du cytosquelette – l'hétérodimère de tubuline, la desmine, la plectine ou une autre protéine appartenant à la famille des protéines associées aux

microtubules (microtubule-associated proteins, MAPs, MAP2) (Appaix et al. 2003, Brdizka 2007, Rostovtseva et Bezrukov 2008, Rostovtseva et al. 2008).

Donc, Gellerich avait raison, en supposant le rôle important de la compartimentation des nucléotides adényliques pour l'efficacité du couplage MtCK-ANT et pour la régulation de la respiration. Sauf que cette hypothèse est applicable plutôt aux mitochondries *in situ* qu'aux mitochondries isolées, la membrane externe desquelles représente une barrière de diffusion sélective pour les nucléotides adényliques (Gellerich et al. 1987).

En se basant sur nos nouvelles données expérimentales concernant les propriétés cinétiques de la MtCK *et* la sélectivité de la perméabilité de la membrane mitochondriale externe *situ* et également, sur les données de la littérature concernant le supercomplexe ATP

synthasome (Chen et al. 2004, Ko et al. 2003, Pedersen 2007a, 2007b, Pedersen et al. 2000) et le complexe formé par la MtCK, l'ANT et le (Dolder et al. 2003, Saks et Aliev 1996, Saks et al. 2004, Smith et al. 2004, Wallimann et al. 1992), nous avons intégré ces complexes protéiques dans une unité fonctionnelle que l'on a nommée **Interactosome Mitochondrial** (Figure 40) (Timohhina et al. 2009). La notion d'interactosome peut également inclure le supercomplexe de la chaîne respiratoire (Lenaz et Genova 2007, Vonck et Schafer 2009). Son rôle est d'assurer l'acheminement des métabolites adényliques, la transphosphorylation et l'exportation de l'énergie du potentiel de phosphorylation de

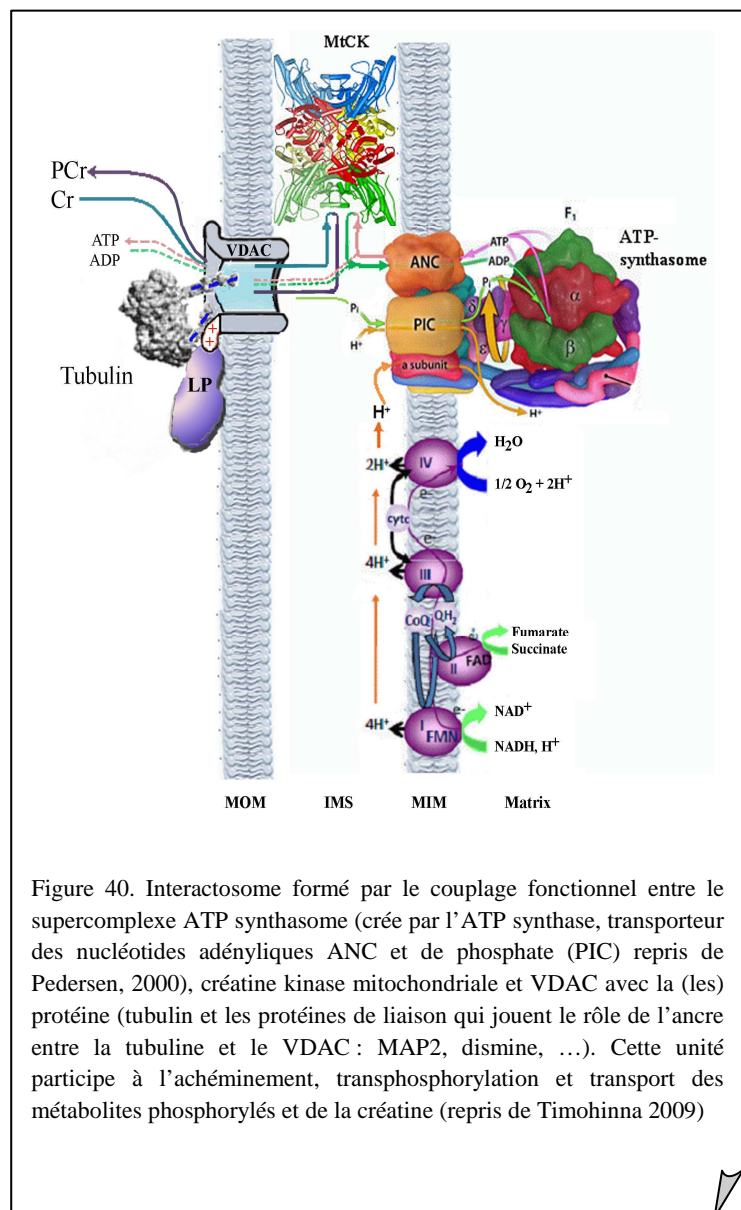


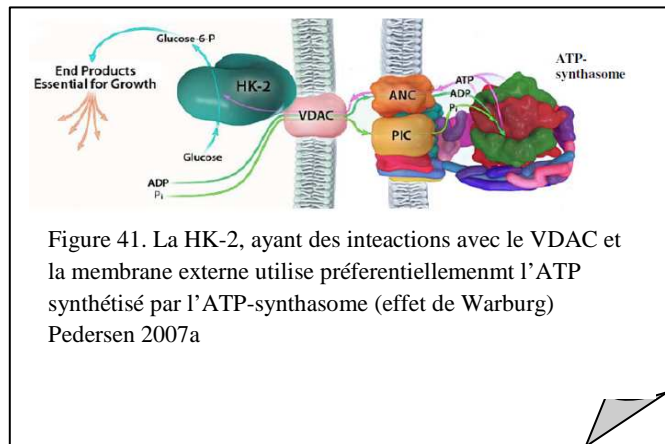
Figure 40. Interactosome formé par le couplage fonctionnel entre le supercomplexe ATP synthasome (créé par l'ATP synthase, transporteur des nucléotides adényliques ANC et de phosphate (PIC) repris de Pedersen, 2000), créatine kinase mitochondriale et VDAC avec la (les) protéine (tubulin et les protéines de liaison qui jouent le rôle de l'ancrage entre la tubuline et le VDAC : MAP2, dismine, ...). Cette unité participe à l'acheminement, transphosphorylation et transport des métabolites phosphorylés et de la créatine (repris de Timohinna 2009)

l'ATP sous forme de flux de PCr. Son fonctionnement est soumis à la théorie du métabolisme

vectoriel et du cheminement vectoriel du ligand, proposé par P. Mitchell, 1979. Initialement, cette théorie a été conceptualisée pour expliquer l'organisation des enzymes en supercomplexes permettant le transport scalaire des électrons et le cheminement vectoriel des protons à travers la membrane interne mitochondriale pour créer le gradient du potentiel électro-chimique (Mitchell 1979, Mitchell 2004). Ultérieurement, ce concept a été appliqué au fonctionnement des navettes de transfert des groupements phosphates, CK/PCr et AK (Dzeja et al. 2007, Dzeja et Terzic 2003, Zeleznikar et al. 1995) et à la transmission du signal [ADP] de rétrocontrôle pour la respiration mitochondriale (Vendelin et al. 2000).

En revanche, la désorganisation du réseau mitochondrial, l'augmentation de la perméabilité du VDAC pour les nucléotides adényliques ($K_m^{app} ADP 25 \pm 4 \mu M$), la perte du contrôle de la respiration par la MtCK associée à l'augmentation de l'activité de l'HK II (Monge et al. 2009) des cellules HL-1NB sont reliées, probablement, à la perte de la propriété

fondamentale de l'interactosome – le cheminement dirigé du ligand qui a pour conséquence la perturbation des flux d'énergie. Ces nouvelles propriétés caractéristiques pour le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses, décrit par Otto Warburg en 1956, sont récemment élucidées dans les travaux de Pedersen (Figure 41) (Pedersen 2007a, 2008, Warburg 1956).



Les mécanismes de régulations de la phosphorylation oxydative *in vivo*

La réponse à la deuxième question, concernant le signal qui pourrait influencer la vitesse de réaction directe de la MtCK en présence d'une concentration saturante en créatine, paraît être évidente – c'est le deuxième substrat de la MtCK, l'ATP mitochondriale. Le mécanisme a été prédit mathématiquement par le modèle VAS de Vendélin, Aliev et Saks et en 1996, 1997, 2000 et par Dos Santos en 2000 (Aliev et Saks 1997, Dos Santos et al. 2000, Saks et Aliev 1996, Vendelin et al. 2000). Ce mécanisme de régulation peut être visualisé en analysant la différence entre deux cinétiques de régulation de la respiration des cardiomyocytes perméabilisés. Premièrement, la cinétique de régulation de la respiration,

stimulée par des additions progressives des concentrations croissantes en ATP exogène en présence de la créatine et, deuxièmement, la cinétique de la même réaction supplémentée avec le système piège pour l'ADP libre, PEP-PK. Dans le premier cas, la respiration est stimulée par deux types d'ADP endogène : extramitochondriale, produit par les ATPases et par les MMCK à partir de l'ATP exogène, et intramitochondriale, produit dans la réaction de la MtCK activée. Le K_m apparent pour l'ATP exogène est très bas ($24\mu\text{M}$), le niveau maximale de la respiration est atteint rapidement. En absence des flux d'ADP extramitochondriaux (consommés par le système PEP-PK), la cinétique de régulation de la respiration mitochondriale contrôlée uniquement par la MtCK est plus lente. **Cette différence cinétique est due à l'effet stimulateur de l'ADP endogène extramitochondrial sur la respiration de la mitochondrie *in situ*.** En conformité avec le modèle VAS et Dos Santos, l'hydrolyse de l'ATP produit une augmentation de la concentration en ADP dans la myofibrille et libère le Pi et le proton. Le Pi, n'étant pas utilisé dans la réaction de la MMCK, diffuse librement et entre dans la matrice mitochondriale via le transporteur spécifique (PIC). L'ADP étant en grande partie utilisé par la réaction de la MtCK grâce à son état hors équilibre, induit une augmentation du flux de production de l'ATP pour les ATPases et la formation d'un gradient de concentration d'ADP transmis vers la matrice (Figure 42a, 42Ba,b). La rephosphorylation de l'ADP dans la réaction de la MMCK change le rapport Cr/PCr dans le sens de l'augmentation du signal métabolique de la créatine. Ce signal est transféré vers la MtCK via la navette CK/PCr. L'ADP, transmis sous forme du gradient cytosolique est rephosphorylé dans la matrice. L'ATP synthétisé, grâce au couplage fonctionnel MtCK-ANT, alimente la réaction de la MtCK (qui est également en état hors équilibre). Le signal initial de l'ADP cytosolique est transformé, de ce fait, en un flux d'énergie (PCr) amplifié et maintenu grâce à la transphosphorylation des ATP mitochondriaux (Figure 42Bc). L'efficacité de production de la PCr par la MtCK est proche de l'efficacité maximale de l'oxydation phosphorylante ($\text{PCr}/\text{O}_2 = 5,7\pm 0,7$) (Guzun et al. 2009, Timohhina et al. 2009). Pour résultats, les réactions catalysées par des différentes isoformes compartimentées de la CK tendent de maintenir la stabilité métabolique intracellulaire (Balaban et al. 1986, Dos Santos et al. 2000, Williamson et al. 1976) et comme « le Démon de Maxwell » (la force interne située à l'échelle moléculaire) sélectionnant et dirigeant les molécules en séparant **les flux informationnelles (Cr, ADP, Pi) des flux énergétiques (PCr)** (Saks et al. 2007b). **Le système de signalisation inclue trois composantes** : premièrement, **le flux de Pi**, deuxièmement, **la modification du rapport Cr/PCr** (où la créatine joue le rôle du rétrocontrôle métabolique et la PCr – du flux énergétique) et troisièmement, **les fluctuations de concentration en ADP endogène**

extramitochondriale amplifiés par la réaction de la MtCK (Figure 42A) (Guzun et al. 2009). Une limitation de la réaction de la MtCK à l'état d'équilibre, en conditions de la perméabilité non limitée de la membrane mitochondriale externe pour la PCr et la créatine, pourrait être un facteur limitant inutile de la phosphorylation oxydative (Saks et Aliev 1996). Dans les conditions de notre modèle expérimental, un mécanisme pouvant limiter la réaction directe de la MtCK est la limitation par le produit final de la réaction, la PCr. Le système PEP-PK en utilisant l'ADP endogène régénère en continu un niveau stable d'ATP extramitochondrial (mesuré en HPLC). En présence d'une quantité importante de créatine exogène dans le milieu, les MMCK produisent la PCr (cette production est également mesurée en HPLC, la réaction avec l'inhibition de la chaîne respiratoire par la roténone). Toutefois, l'augmentation de l'affinité apparente de la MtCK *in situ* pour la créatine témoigne du contraire. La réaction catalysée par la MtCK se déroule en sens directe, de production de la PCr. Ce phénomène peut être évité par l'utilisation d'une solution contenant du Ca^{2+} nécessaire pour l'activité des ATPases.

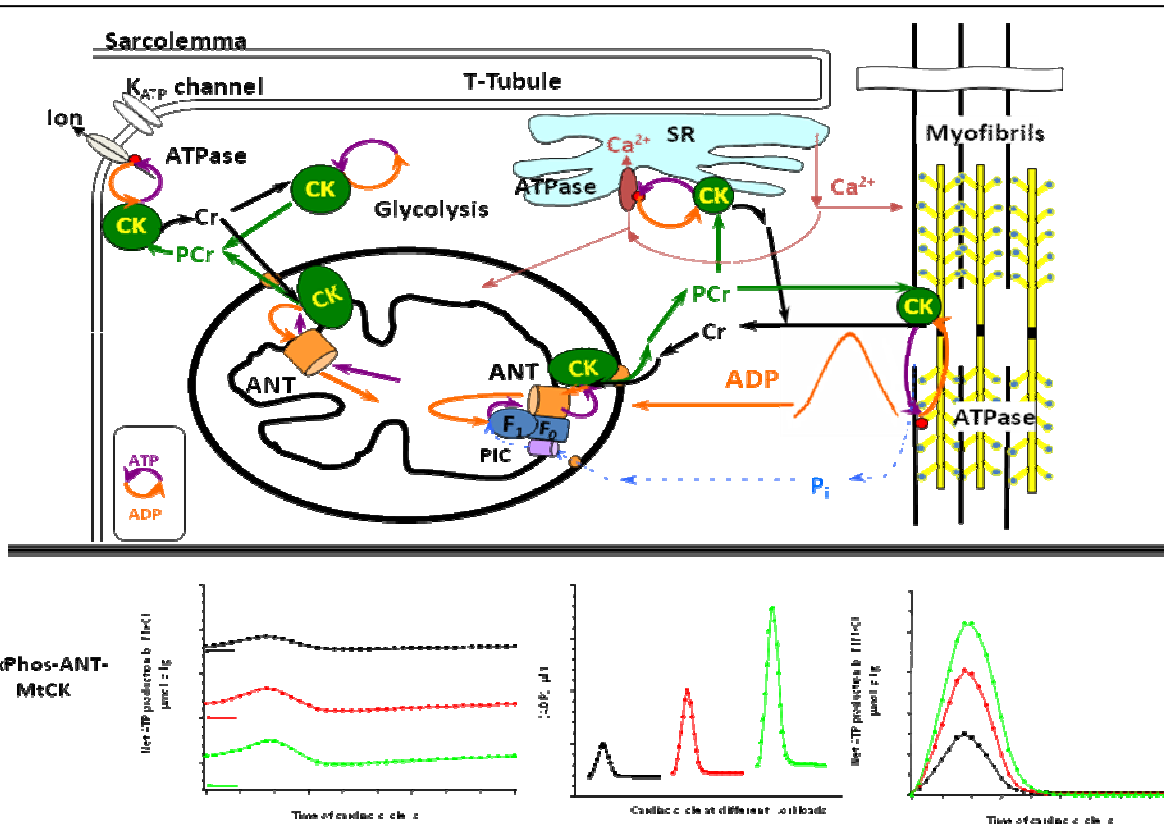


Figure 42A. Schéma représentant une unité énergétique intracellulaire dans les cardiomyocytes.

Les sites d'utilisation de l'ATP (les ATPases de la myosine, du réticulum sarcoplasmique, de la pompe Na^+/K^+) et de régénération de l'ATP (F_0F_1 représente la phosphorylation oxydative) sont reliés par le transfert du flux de l'énergie (PCr) et du signal métabolique (Cr) via la navette CK/PCr et deux signaux supplémentaires : l'ADP cytosolique et le P_i issus de l'hydrolyse de l'ATP.

Figure 42B. Représentations graphiques représentant la modélisation mathématique de la régulation de la respiration mitochondriale dans les cardiomyocytes (Dos Santos et al. 2000, Saks et al. 2007c).

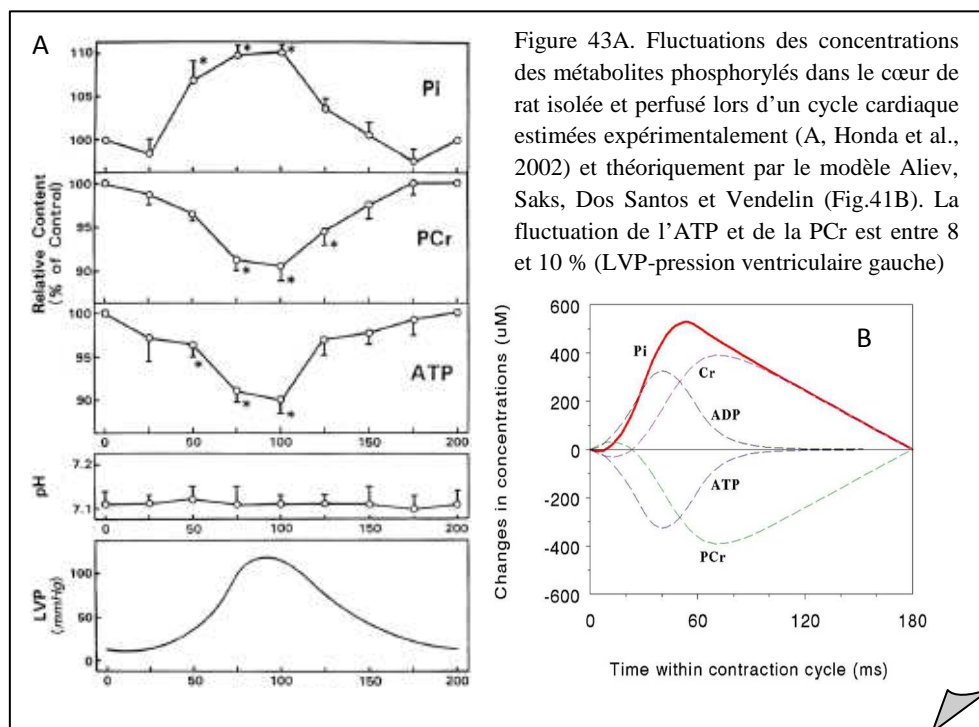
(a) représente les fluctuations des concentrations d'ADP produites dans les myofibrilles par l'hydrolyse de l'ATP. (Les pics de concentration d'ADP cytosolique correspondent aux différentes charges de travail (ligne noire – $750 \mu\text{M}$; la ligne rouge - $1500 \mu\text{M}$ et la ligne verte – $2250 \mu\text{M}$.)

(b) montre la production nette de l'ATP dans la réaction de la MMCK myofibrillaire (hors équilibre) en fonction du travail cardiaque (pics de concentrations d'ADP) décrit dans (a).

(c) montre la production nette de la PCr dans la réaction de la MtCK (hors équilibre) en fonction du travail cardiaque (indiqué par les flèches colorées).

L'hydrolyse de l'ATP lors de la contraction musculaire produit une fluctuation des concentrations d'ADP associée à la libération du P_i (qui entre dans la matrice mitochondriale via son transporteur). La concentration d'ADP libérée (a) est en grande partie rephosphorylée dans la réaction de la MMCK (b) à partir de la PCr. La créatine libérée par cette réaction sert de signal métabolique de rétrocontrôle pour la mitochondrie. En partie (à cause de l'absence du couplage de la MMCK avec l'ATPases), les fluctuations des concentrations d'ADP créent un gradient de concentration de la myofibrille vers la mitochondrie et sert à régénérer l'ATP mitochondriale en entrant dans la matrice via l'ANT. Cette ATP, étant cheminé vers la MtCK (grâce au couplage fonctionnel entre la MtCK et l'ANT), est utilisé par cette dernière pour produire un flux stable de PCr (c) grâce aux transferts ATP/ADP et Cr/PCr entre l'ATP synthase et la MtCK.

Les estimations théoriques des mécanismes de la régulation de la respiration mitochondriale des cellules cardiaques faites par Aliev, Saks, Dos Santos et Vendelin (Figure 43B) ont été prouvées *in vivo* en utilisant la ^{31}P PRMS (Honda et al. 2002, Spindler et al. 2001) et expérimentalement par notre étude. L'étude par spectroscopie en résonance magnétique du ^{31}P du cœur isolé et perfusé (Honda et al. 2002) a permis de montrer que la fluctuation des métabolites phosphorylés au cours du cycle cardiaque peuvent dépendre de la charge de travail et des propriétés intrinsèques cinétiques de la myosine (Figure 43A).



L'influence de la doxorubicine sur la cinétique de régulation de la respiration des fibres perméabilisées du cœur de rat perfusé.

Les méthodes d'investigations de la régulation de la respiration mitochondriale *in situ* utilisées précédemment ont été appliquées afin de vérifier si l'effet cardiotoxique de la doxorubicine était lié à la diminution du contrôle de la respiration mitochondriale par la MtCK et, de ce fait, de la production aérobie de la PCr.

La préservation de la respiration en Stade 3 (conformément Chance) des fibres perméabilisées issues du cœur perfusé pendant 2h avec 2 μM DOX, concorde avec les données de Pélican et al. (Chance et Williams 1956, Pelikan et al. 1988). Néanmoins, la

respiration (V_{\max}) des fibres perméabilisées incubées directement en présence des concentrations croissantes de DOX, diminue progressivement jusqu'au 28,5% pour 500 μM DOX. L'inhibition de la respiration mitochondriale par la DOX est très bien décrite et a été même proposée comme indicateur de toxicité du médicament dans les études pharmacologiques (Ishikawa et al. 2006, Tao et al. 2008, Tao et al. 2006). La diminution dose-dépendent du K_m apparent pour l'ADP libre des fibres perméabilisée et traitées par la DOX, peut être due à la diminution de la restriction de la diffusion des nucléotides adényliques au niveau de la membrane mitochondriale externe, confirmant l'hypothèse d'augmentation de la transition de perméabilité mitochondriale proposée antérieurement (Oliveira et al. 2006, Soud et al. 2006, Tao et al. 2006). L'augmentation de l'affinité apparente de la respiration mitochondriale pour l'ADP libre était associée à une diminution importante du couplage fonctionnel de la MtCK avec l'ANT. Le rapport du $K_m^{\text{app}}\text{ADP}(-\text{Cr})/K_m^{\text{app}}\text{ADP}(+\text{Cr})$ était de 1,4 pour les fibres traitées par 500 μM DOX et de 18 pour des fibres non traitées.

L'affinité de la MtCK pour la créatine diminue progressivement en fonction de la concentration en MtCK avec la perte totale de l'effet stimulateur de la créatine sur la respiration des fibres traitées par 500 μM DOX. Cet effet pourrait être dû à l'altération de la fixation de la MtCK aux cardiolipines par la DOX avec comme suite la perte du couplage fonctionnel de la MtCK avec l'ANT décrite par Tokarska-Schlattner (Tokarska-Schlattner et al. 2002, Tokarska-Schlattner et al. 2007). De plus, il a été montré que la diminution de la respiration mitochondriale corrèle avec la diminution de la concentration de la protéine ANT (Oliveira et Wallace 2006).

En conclusion, la doxorubicine induisant des perturbations des couplages structurales et fonctionnels de la MtCK avec l'ANT, provoque des importantes troubles de régulation du contrôle respiratoire par la MtCK.

LA BIOENERGETIQUE DE LA DYSFONCTION MUSCULAIRE ET LES EFFETS DE L'ENTRAINEMENT EN ENDURANCE DES MALADES ATTEINTS DE BRONCHOPNEUMOPATHIE OCHRONIQUE OBSTRUCTIVE

Les méthodes d'investigations utilisées précédemment chez le rat ont été appliquées à l'étude de la régulation de la respiration mitochondriale des muscles squelettiques des patients atteints de BPCO, avant et après l'entraînement en endurance, afin de vérifier si cet entraînement augmente la capacité oxydative des muscles squelettiques, en influençant les mécanismes de régulation de la respiration mitochondriale et en augmentant le rôle du contrôle métabolique par la MtCK.

Les résultats de notre étude montrent que, chez les patients et les volontaires sains avant l'entraînement, les vitesses de respiration basale (V_0) et maximale (V_{max} , stimulé par 2 mM ADP), des fibres squelettiques issues des biopsies et mesurées en oxygraphie, sont identiques même si la consommation en oxygène (V_{O_2} , mesurée lors d'un test incrémental sur cycloergomètre) est deux fois plus basse dans le groupe BPCO par rapport au groupe contrôle. Ces résultats concordent avec ceux décrits par Garnier (Garnier et al. 2005) lors de son étude sur les insuffisants cardiaques et les sédentaires sains et par Guerrero (Guerrero et al. 2005) qui a comparé la respiration des fibres squelettiques perméabilisées des transplantés pulmonaires et les volontaires sains non-sédentaires.

Par contre, l'entraînement en endurance à domicile n'a pas entraîné de modifications significatives ni de V_0 ni de V_{max} dans chacun des deux groupes. Ce résultat est également cohérent avec l'absence de changement de type des fibres musculaires, mais n'explique pas l'augmentation de la V_{O_2} dans le groupe BPCO après l'entraînement. Plusieurs études montrent une dépendance linéaire entre la V_{max} et la $V_{O_{2max}}$ ou la V_{max} et la V_{O_2} en seuil ventilatoire chez les sujets sains en fonction de l'entraînement (Daussin et al. 2008, Garnier et al. 2005, Zoll et al. 2002) ou une absence de modification significative du rapport V_{max}/V_0 et l'absence de corrélation linéaire entre la V_{max} et la V_{O_2} chez les transplantés cardiaques suite à un entraînement (6 semaines, 45 minutes par semaine, Zoll et al. 2003). L'absence de différence de la V_{max} entre les deux groupes serait en faveur d'une absence de myopathie mitochondriale dans les muscles squelettiques, chez les patients atteints de BPCO. **L'absence de l'augmentation de la V_{max} suite à l'entraînement en endurance pourrait être expliquée par le fait que l'amélioration de la capacité maximale à l'exercice des patients atteints de BPCO n'est pas reliée à la capacité oxydative des muscles squelettiques.**

De plus, l'affinité apparente de la phosphorylation oxydative pour l'ADP libre, diminue après l'entraînement dans les deux groupes reflétant l'augmentation des propriétés oxydative de la régulation de la respiration mitochondriale. L'augmentation du K_m apparent pour l'ADP libre en fonction de l'augmentation de l'activité physique est bien connue et à été décrite dans le modèle animale, pour les patients atteints d'insuffisance cardiaque, de l'artériopathie périphérique, chez les transplantés pulmonaires et chez les athlètes (Guerrero et al. 2005, Zoll et al. 2002). La diminution de l'affinité de la phosphorylation oxydative pour l'ADP libre peut être due à l'augmentation de la restriction de la perméabilité de la membrane externe mitochondriale pour l'ADP (Saks et al. 1993).

Afin de vérifier le possible rôle de la MtCK sur la régulation de la respiration, le K_m apparent pour l'ADP libre en présence de la créatine (i.e. la MtCK activée) a été mesuré. On observe une diminution de celui-ci par rapport au K_m apparent pour l'ADP libre sans créatine dans les deux groupes. Ce comportement du système a bien été décrit dans la littérature (Guerrero et al. 2005, Ponsot et al. 2006, Zoll et al. 2006, Zoll et al. 2003, Zoll et al. 2002) qui a été attribué au renforcement du couplage fonctionnel de la MtCK avec l'ANT dans le contrôle respiratoire après l'entraînement.

Ensuite, nous avons estimé la cinétique de régulation de la respiration mitochondriale par la créatine en utilisant le protocole élaboré lors des études 1 et 2 décrit précédemment. L'affinité de la MtCK pour la créatine est similaire dans les deux groupes et n'a pas changé lors de l'entraînement. Ces résultats concordent avec ceux décrits par Garnier, lors de son étude sur les insuffisants cardiaques, en mesurant l'activité de la créatine kinase totale, cytosolique et mitochondriale dans le muscle squelettiques et ne montrent pas de modification de l'activité enzymatique induite par l'activité physique (Garnier et al. 2005).

Dans les deux groupes, l'entraînement à l'endurance a plutôt induit des modifications qualitatives (pas d'augmentation quantitative de la capacité oxydative (V_{max}), manifestées par une régulation de la respiration mitochondriale plus oxydative.

CONCLUSION

Les mécanismes de régulation du métabolisme énergétique dépendent du niveau d'organisation cellulaire.

En effet, les cardiomyocytes et les cellules HL-1NB possèdent une organisation intracellulaire différente qui est corrélée à une régulation de la respiration mitochondriale et des flux d'énergie (CK) différente.

Dans les cardiomyocytes, caractérisés par un réseau mitochondrial hautement structuré, la respiration est contrôlée par la MtCK afin de surmonter les restrictions de la diffusion des nucléotides adényliques alors que dans les cellules HL-1NB, possédant un réseau irrégulier et dynamique des mitochondries, l'expression de la CK est significativement diminuée et le contrôle de la respiration par la créatine est absent et remplacé par l'HK-II.

Dans les cardiomyocytes *in vivo*, il existe une forte restriction à la diffusion des nucléotides adényliques au niveau de la membrane externe mitochondriale *in situ*.

Cette restriction est due au contrôle sélectif de la perméabilité de la membrane externe mitochondriale via l'interaction (association) des protéines du cytosquelette (tubuline et linker proteins) avec le VDAC au sein des Interactosomes mitochondriaux.

L'utilisation de l'ATP et sa régénération dans la mitochondrie sont interconnectées par l'intermédiaire des fluctuations cycliques de l'ADP cytosolique, du Pi et de la créatine grâce au fonctionnement de la MtCK et de la MMCK hors d'équilibre dans directions opposées et à la signalisation rétrograde (i.e. propriétés au niveau du système).

La doxorubicine induit des perturbations dans le couplage structural et fonctionnel de la MtCK avec l'ANT et provoque d'importantes troubles de régulation du contrôle respiratoire par la MtCK.

Chez les patients atteints de BPCO, l'entraînement à l'endurance a induit une régulation de la respiration mitochondriale plus oxydative, en augmentant le rôle du contrôle métabolique par la MtCK dû à un renforcement du couplage fonctionnel de la MtCK avec l'ANT dans le contrôle respiratoire après l'entraînement.

BIBLIOGRAPHIE

- ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166, 1, 111-117.
- ABRAHAM M. R., SELIVANOV V. A., HODGSON D. M. *et al.* Coupling of cell energetics with membrane metabolic sensing. Integrative signaling through creatine kinase phosphotransfer disrupted by M-CK gene knock-out. *J Biol Chem*, 2002, 277, 27, 24427-24434.
- AGUSTI A. Physical activity and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 177, 7, 675-676.
- AGUSTI A., MORLA M., SAULEDA J. *et al.* NF-kappaB activation and iNOS upregulation in skeletal muscle of patients with COPD and low body weight. *Thorax*, 2004, 59, 6, 483-487.
- AGUSTI A. G., NOGUERA A., SAULEDA J. *et al.* Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 2003, 21, 2, 347-360.
- AGUSTI A. G., SAULEDA J., MIRALLES C. *et al.* Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166, 4, 485-489.
- ALIEV M. K. et SAKS V. A. Compartmentalized energy transfer in cardiomyocytes: use of mathematical modeling for analysis of in vivo regulation of respiration. *Biophys J*, 1997, 73, 1, 428-445.
- ALSTED T. J., NYBO L., SCHWEIGER M. *et al.* Adipose triglyceride lipase in human skeletal muscle is upregulated by exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 296, 3, E445-453.
- ANMANN T., GUZUN R., BERAUD N. *et al.* Different kinetics of the regulation of respiration in permeabilized cardiomyocytes and in HL-1 cardiac cells. Importance of cell structure/organization for respiration regulation. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1757, 12, 1597-1606.
- APPAIX F., KUZNETSOV A. V., USSON Y. *et al.* Possible role of cytoskeleton in intracellular arrangement and regulation of mitochondria. *Exp Physiol*, 2003, 88, 1, 175-190.
- APPLE F. S. et ROGERS M. A. Mitochondrial creatine kinase activity alterations in skeletal muscle during long-distance running. *J Appl Physiol*, 1986, 61, 2, 482-485.
- APPLE F. S., ROGERS M. A., CASAL D. C. *et al.* Creatine kinase-MB isoenzyme adaptations in stressed human skeletal muscle of marathon runners. *J Appl Physiol*, 1985, 59, 1, 149-153.
- ARMSTRONG R. B. Magnitude and distribution of muscle blood flow in conscious animals during locomotory exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 1988, 20, 5 Suppl, S119-123.
- ATS. ATS/ACCP Statement on cardiopulmonary exercise testing. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167, 2, 211-277.
- BALABAN R. S. Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, 34, 10, 1259-1271.
- BALABAN R. S. Domestication of the cardiac mitochondrion for energy conversion, *J Mol Cell Cardiol*, 2009, doi:10.1016/yjmcc.2009.02.018.
- BALABAN R. S., KANTOR H. L., KATZ L. A. *et al.* Relation between work and phosphate metabolite in the in vivo paced mammalian heart. *Science*, 1986, 232, 4754, 1121-1123.
- BANIENE R., NAUCIENE Z., MASLAUSKAITE S. *et al.* Contribution of ATP synthase to stimulation of respiration by Ca²⁺ in heart mitochondria. *Syst Biol (Stevenage)*, 2006, 153, 5, 350-353.
- BEARD D. A. A biophysical model of the mitochondrial respiratory system and oxidative phosphorylation. *PLoS Comput Biol*, 2005, 1, 4, e36.

- BEARD D. A. Modeling of oxygen transport and cellular energetics explains observations on in vivo cardiac energy metabolism. *PLoS Comput Biol*, 2006, 2, 9, e107.
- BELITZER V. A. et TSYBAKOVA E. T. About mechanism of phosphorylation, respiratory coupling. *Biokhimiya*, 1939, 4, 516-534.
- BERAUD N., PELLOUX S., USSON Y. *et al.* Mitochondrial dynamics in heart cells: Very low amplitude high frequency fluctuations in adult cardiomyocytes and flow motion in non beating HI-1 cells, *J Bioenerg Biomembr*, 2009, doi:10.1007/s10863-009-9214-x.
- BERGSTRÖM J. Electrolytes in man: determination by neutron activation analysis on needle biopsy specimens: a study on normal subjects, kidney patients and patients with chronic diarrhoea. *Scand J Clin Lab Invest*, 1962, 14, 1-110.
- BERNARD C. Introduction À L'étude De La Médecine Expérimentale., Paris: Champs-Flammarion, 1984, 381.
- BERS D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 2002, 415, 6868, 198-205.
- BESSMAN S. P. et CARPENTER C. L. The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu Rev Biochem*, 1985, 54, 831-862.
- BIANCHET M. A. et AMZEL L. M. Making the right moves. *Structure*, 2007, 15, 8, 885-886.
- BIANCHET M. A., PEDERSEN P. L. et AMZEL L. M. Notes on the mechanism of ATP synthesis. *J Bioenerg Biomembr*, 2000, 32, 5, 517-521.
- BIANCHI K., RIMESSI A., PRANDINI A. *et al.* Calcium and mitochondria: mechanisms and functions of a troubled relationship. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1742, 1-3, 119-131.
- BOSE S., FRENCH S., EVANS F. J. *et al.* Metabolic network control of oxidative phosphorylation: multiple roles of inorganic phosphate. *J Biol Chem*, 2003, 278, 40, 39155-39165.
- BOYER P. D. The ATP synthase - a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem*, 1997, 66, 717-749.
- BRANDES R. et BERS D. M. Simultaneous measurements of mitochondrial NADH and Ca(2+) during increased work in intact rat heart trabeculae. *Biophys J*, 2002, 83, 2, 587-604.
- BRDIZKA D. In *Molecular System Bioenergetics. Energy for Life.: Mitochondrial VDAC and its complexes.* (Saks V.), Wiley-VCH: Weinheim, GmbH, Germany, 2007, 165-194.
- BRINI M. Ca(2+) signalling in mitochondria: mechanism and role in physiology and pathology. *Cell Calcium*, 2003, 34, 4-5, 399-405.
- BROEKHUIZEN R., WOUTERS E. F., CREUTZBERG E. C. *et al.* Raised CRP levels mark metabolic and functional impairment in advanced COPD. *Thorax*, 2006, 61, 1, 17-22.
- BROOKES P. S., YOON Y., ROBOTHAM J. L. *et al.* Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287, 4, C817-833.
- CAVE A. C., INGWALL J. S., FRIEDRICH J. *et al.* ATP synthesis during low-flow ischemia: influence of increased glycolytic substrate. *Circulation*, 2000, 101, 17, 2090-2096.
- CHANCE B. et WILLIAMS G. R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem*, 1956, 17, 65-134.
- CHAUVEAU M. A. et KAUFMANN M. Experiences pour la détermination du coefficient de l'activité nutritive et respiratoire des muscles en repos et en travail. *C R Acad Sci*, 1887, 104, 1126-1132.
- CHEN C., KO Y., DELANNOY M. *et al.* Mitochondrial ATP synthasome: three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem*, 2004, 279, 30, 31761-31768.

- CHEN C., SAXENA A. K., SIMCOKE W. N. *et al.* Mitochondrial ATP synthase. Crystal structure of the catalytic F1 unit in a vanadate-induced transition-like state and implications for mechanism. *J Biol Chem*, 2006, 281, 19, 13777-13783.
- CHEVROLLIER A., LOISEAU D. et STEPIEN G. What is the specific role of ANT2 in cancer cells? *Med Sci (Paris)*, 2005, 21, 2, 156-161.
- CHOI S. Y., GONZALVEZ F., JENKINS G. M. *et al.* Cardiolipin deficiency releases cytochrome c from the inner mitochondrial membrane and accelerates stimuli-elicited apoptosis. *Cell Death Differ*, 2007, 14, 3, 597-606.
- COLOMBINI M. A candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane. *Nature*, 1979, 279, 5714, 643-645.
- COOKE R. et BIALEK W. Contraction of glycerinated muscle fibers as a function of the ATP concentration. *Biophys J*, 1979, 28, 2, 241-258.
- COOKE R. et PATE E. The effects of ADP and phosphate on the contraction of muscle fibers. *Biophys J*, 1985, 48, 5, 789-798.
- CORTASSA S., AON M. A., MARBAN E. *et al.* An integrated model of cardiac mitochondrial energy metabolism and calcium dynamics. *Biophys J*, 2003, 84, 4, 2734-2755.
- COSTILL D. L., FINK W. J., GETCHELL L. H. *et al.* Lipid metabolism in skeletal muscle of endurance-trained males and females. *J Appl Physiol*, 1979, 47, 4, 787-791.
- DAUSSIN F. N., ZOLL J., PONSOT E. *et al.* Training at high exercise intensity promotes qualitative adaptations of mitochondrial function in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 2008, 104, 5, 1436-1441.
- DE GROOF A. J., OERLEMANS F. T., JOST C. R. *et al.* Changes in glycolytic network and mitochondrial design in creatine kinase-deficient muscles. *Muscle Nerve*, 2001, 24, 9, 1188-1196.
- DE LA FUENTE I. M., MARTINEZ L., PEREZ-SAMARTIN A. L. *et al.* Global self-organization of the cellular metabolic structure. *PLoS ONE*, 2008, 3, 8, e3100.
- DEDKOVA E. N. et BLATTER L. A. Mitochondrial Ca²⁺ and the heart. *Cell Calcium*, 2008, 44, 1, 77-91.
- DEN HOED M., HESSELINK M. K., VAN KRANENBURG G. P. *et al.* Habitual physical activity in daily life correlates positively with markers for mitochondrial capacity. *J Appl Physiol*, 2008, 105, 2, 561-568.
- DETRE J. A., KORETSKY A. P., WILLIAMS D. S. *et al.* Absence of pH changes during altered work in the in vivo sheep heart: a 31P-NMR investigation. *J Mol Cell Cardiol*, 1990, 22, 5, 543-553.
- DOBESH D. P., KONHILAS J. P. et DE TOMBE P. P. Cooperative activation in cardiac muscle: impact of sarcomere length. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 282, 3, H1055-1062.
- DOLDER M., WALZEL B., SPEER O. *et al.* Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation. *J Biol Chem*, 2003, 278, 20, 17760-17766.
- DOS SANTOS P., ALIEV M. K., DIOLEZ P. *et al.* Metabolic control of contractile performance in isolated perfused rat heart. Analysis of experimental data by reaction:diffusion mathematical model. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32, 9, 1703-1734.
- DOS SANTOS P, KOWALTOWSKI AJ, LACLAU M *et al.* Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel protects the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 283, H284-295.
- DYCK J. R. et LOPASCHUK G. D. Malonyl CoA control of fatty acid oxidation in the ischemic heart. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, 34, 9, 1099-1109.

- DZEJA P., CHUNG S. et TERZIC A. In Molecular System Bioenergetics. Energy for life: Integration of adenylate kinase and glycolytic and glycogenolytic circuits in cellular energetics. (Saks V.), Wiley –VCH: Weinheim, GmbH, Germany, 2007, 195 -264.
- DZEJA P. P. et TERZIC A. Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J Exp Biol*, 2003, 206, Pt 12, 2039-2047.
- DZEJA P. P. et TERZIC A. Handbook of Neurochemistry & Molecular Neurobiology: Brain Energetics: Mitochondrial-nucleus energetic communication: role of phosphotransfer networks in processing cellular information (Gibson G. and Dienel G.), Springer Science, New York, 2005, 614-666.
- DZEJA P. P., ZELEZNIKAR R. J. et GOLDBERG N. D. Suppression of creatine kinase-catalyzed phosphotransfer results in increased phosphoryl transfer by adenylate kinase in intact skeletal muscle. *J Biol Chem*, 1996, 271, 22, 12847-12851.
- DZEJA P. P., ZELEZNIKAR R. J. et GOLDBERG N. D. Adenylate kinase: kinetic behavior in intact cells indicates it is integral to multiple cellular processes. *Mol Cell Biochem*, 1998, 184, 1-2, 169-182.
- DZEJA P. P., TERZIC A. et WIERINGA B. Phosphotransfer dynamics in skeletal muscle from creatine kinase gene-deleted mice. *Mol Cell Biochem*, 2004, 256-257, 1-2, 13-27.
- DZEJA P. P., VITKEVICIUS K. T., REDFIELD M. M. *et al.* Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium: increased contribution in heart failure. *Circ Res*, 1999, 84, 10, 1137-1143.
- EIMRE M., PUHKE R., ALEV K. *et al.* Altered mitochondrial apparent affinity for ADP and impaired function of mitochondrial creatine kinase in gluteus medius of patients with hip osteoarthritis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006, 290, 5, R1271-1275.
- ENGELHARDT W. A. Life and Science. *Annu Rev Biochem*, 1982, 51, 1-19.
- EPPENBERGER-EBERHARDT M., RIESINGER I., MESSERLI M. *et al.* Adult rat cardiomyocytes cultured in creatine-deficient medium display large mitochondria with paracrystalline inclusions, enriched for creatine kinase. *J Cell Biol*, 1991, 113, 2, 289-302.
- FONTAINE E. M., KERIEL C., LANTUEJOUL S. *et al.* Cytoplasmic cellular structures control permeability of outer mitochondrial membrane for ADP and oxidative phosphorylation in rat liver cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 213, 1, 138-146.
- FUKUDA N. et GRANZIER H. L. Titin/connectin-based modulation of the Frank-Starling mechanism of the heart. *J Muscle Res Cell Motil*, 2005, 26, 6-8, 319-323.
- FUKUDA N., SASAKI D., ISHIWATA S. *et al.* Length dependence of tension generation in rat skinned cardiac muscle: role of titin in the Frank-Starling mechanism of the heart. *Circulation*, 2001, 104, 14, 1639-1645.
- FULLER E. O., GOLDBERG D. I., STARNES J. W. *et al.* Mitochondrial respiration following acute hypoxia in the perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 1985, 17, 1, 71-81.
- GARNIER A., FORTIN D., ZOLL J. *et al.* Coordinated changes in mitochondrial function and biogenesis in healthy and diseased human skeletal muscle. *Faseb J*, 2005, 19, 1, 43-52.
- GELLERICH F. et SAKS V. A. Control of heart mitochondrial oxygen consumption by creatine kinase: the importance of enzyme localization. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982, 105, 4, 1473-1481.

- GELLERICH F. N., SCHLAME M., BOHNENSACK R. *et al.* Dynamic compartmentation of adenine nucleotides in the mitochondrial intermembrane space of rat-heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1987, 890, 2, 117-126.
- GELLERICH F. N., TRUMBECKAITE S., OPALKA J. R. *et al.* Function of the mitochondrial outer membrane as a diffusion barrier in health and diseases. *Biochem Soc Trans*, 2000, 28, 2, 164-169.
- GORDON A. M., HOMSHER E. et REGNIER M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev*, 2000, 80, 2, 853-924.
- GORDON A. M., REGNIER M. et HOMSHER E. Skeletal and cardiac muscle contractile activation: tropomyosin "rocks and rolls". *News Physiol Sci*, 2001, 16, 49-55.
- GORSELINK M., DROST M. R., COUMANS W. A. *et al.* Impaired muscular contractile performance and adenine nucleotide handling in creatine kinase-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001, 281, 3, E619-625.
- GOSKER H. R., WOUTERS E. F., VAN DER VUSSE G. J. *et al.* Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease and chronic heart failure: underlying mechanisms and therapy perspectives. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71, 5, 1033-1047.
- GOSKER H. R., ENGELEN M. P., VAN MAMEREN H. *et al.* Muscle fiber type IIX atrophy is involved in the loss of fat-free mass in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr*, 2002a, 76, 1, 113-119.
- GOSKER H. R., VAN MAMEREN H., VAN DIJK P. J. *et al.* Skeletal muscle fibre-type shifting and metabolic profile in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 2002b, 19, 4, 617-625.
- GRANZIER H. L. et LABEIT S. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res*, 2004, 94, 3, 284-295.
- GREINER A., ESTERHAMMER R., BAMMER D. *et al.* High-energy phosphate metabolism in the calf muscle of healthy humans during incremental calf exercise with and without moderate cuff stenosis. *Eur J Appl Physiol*, 2007, 99, 5, 519-531.
- GRIFFITHS E. J. et RUTTER G. A. Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, 2009,
- GRUETER C. E., ABIRIA S. A., DZHURA I. *et al.* L-type Ca²⁺ channel facilitation mediated by phosphorylation of the beta subunit by CaMKII. *Mol Cell*, 2006, 23, 5, 641-650.
- GUDBJARNASON S., MATHES P. et RAVENS K. G. Functional compartmentation of ATP and creatine phosphate in heart muscle. *J Mol Cell Cardiol*, 1970, 1, 3, 325-339.
- GUERRERO K., WUYAM B., MEZIN P. *et al.* Functional coupling of adenine nucleotide translocase and mitochondrial creatine kinase is enhanced after exercise training in lung transplant skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 289, 4, R1144-1154.
- GUNTER T. E., YULE D. I., GUNTER K. K. *et al.* Calcium and mitochondria. *FEBS Lett*, 2004, 567, 1, 96-102.
- GUZUN R., TIMOHHINA N., TEPP K. *et al.* Regulation of respiration controlled by mitochondrial creatine kinase in permeabilized cardiac cells in situ Importance of system level properties, *Biochim Biophys Acta*, 2009, doi:10.1016/j.bbabo.2009.03.024.
- HAMMAN B. L., BITTL J. A., JACOBUS W. E. *et al.* Inhibition of the creatine kinase reaction decreases the contractile reserve of isolated rat hearts. *Am J Physiol*, 1995, 269, 3 Pt 2, H1030-1036.

- HARRIDGE S. D., BOTTINELLI R., CANEPARI M. *et al.* Whole-muscle and single-fibre contractile properties and myosin heavy chain isoforms in humans. *Pflugers Arch*, 1996, 432, 5, 913-920.
- HARRISSON G. I., WIJHE M. H., DE GROOT B. *et al.* CK inhibition accelerates transcytosolic energy signaling during rapid workload steps in isolated rabbit hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 1999, 276, H134–H140.
- HASSINEN I. E. et HILTUNEN K. Respiratory control in isolated perfused rat heart. Role of the equilibrium relations between the mitochondrial electron carriers and the adenylate system. *Biochim Biophys Acta*, 1975, 408, 3, 319-330.
- HIBBERD M. G. et JEWELL B. R. Calcium- and length-dependent force production in rat ventricular muscle. *J Physiol*, 1982, 329, 527-540.
- HOCHACHKA P. W. Intracellular convection, homeostasis and metabolic regulation. *J Exp Biol*, 2003, 206, Pt 12, 2001-2009.
- HOLLOSZY J. O. Regulation by exercise of skeletal muscle content of mitochondria and GLUT4. *J Physiol Pharmacol*, 2008, 59 Suppl 7, 5-18.
- HOLLOSZY J. O. et BOOTH F. W. Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu Rev Physiol*, 1976, 38, 273-291.
- HOM J. et SHEU S. S. Morphological dynamics of mitochondria - A special emphasis on cardiac muscle cells, *J Mol Cell Cardiol*, 2009, doi:10.1016/j.yjmcc.2009.02.023.
- HONDA H., TANAKA K., AKITA N. *et al.* Cyclical changes in high-energy phosphates during the cardiac cycle by pacing-Gated 31P nuclear magnetic resonance. *Circ J*, 2002, 66, 1, 80-86.
- HOOD D. A. Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 2001, 90, 3, 1137-1157.
- HORNEMANN T., KEMPA S., HIMMEL M. *et al.* Muscle-type creatine kinase interacts with central domains of the M-band proteins myomesin and M-protein. *J Mol Biol*, 2003, 332, 4, 877-887.
- HORNIKOVA D., HERMAN P., MEJSNAR J. *et al.* Creatine kinase structural changes induced by substrates. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1794, 2, 270-274.
- HOWALD H., HOPPELER H., CLAASSEN H. *et al.* Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. *Pflugers Arch*, 1985, 403, 4, 369-376.
- HWANG J. H., PAN J. W., HEYDARI S. *et al.* Regional differences in intramyocellular lipids in humans observed by in vivo 1H-MR spectroscopic imaging. *J Appl Physiol*, 2001, 90, 4, 1267-1274.
- IRVING T. C., KONHILAS J., PERRY D. *et al.* Myofilament lattice spacing as a function of sarcomere length in isolated rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 279, 5, H2568-2573.
- ISHIKAWA T., ZHU B. L. et MAEDA H. Effects of therapeutic agents on cellular respiration as an indication of metabolic activity. *Hum Exp Toxicol*, 2006, 25, 3, 135-140.
- JACOBUS W. E. et LEHNINGER A. L. Creatine kinase of rat heart mitochondria. Coupling of creatine phosphorylation to electron transport. *J Biol Chem*, 1973, 248, 13, 4803-4810.
- JACOBUS W. E. et SAKS V. A. Creatine kinase of heart mitochondria: changes in its kinetic properties induced by coupling to oxidative phosphorylation. *Arch Biochem Biophys*, 1982, 219, 1, 167-178.
- JACOBUS W. E., MOREADITH R. W. et VANDEGAER K. M. Mitochondrial respiratory control. Evidence against the regulation of respiration by extramitochondrial phosphorylation potentials or by [ATP]/[ADP] ratios. *J Biol Chem*, 1982, 257, 5, 2397-2402.

- JAKOBSSON P., JORFELDT L. et BRUNDIN A. Skeletal muscle metabolites and fibre types in patients with advanced chronic obstructive pulmonary disease (COPD), with and without chronic respiratory failure. *Eur Respir J*, 1990, 3, 2, 192-196.
- JANSSEN E., DZEJA P. P., OERLEMANS F. *et al.* Adenylate kinase 1 gene deletion disrupts muscle energetic economy despite metabolic rearrangement. *Embo J*, 2000, 19, 23, 6371-6381.
- JENESON J. A., WESTERHOFF H. V. et KUSHMERICK M. J. A metabolic control analysis of kinetic controls in ATP free energy metabolism in contracting skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 279, 3, C813-832.
- JENESON J. A., WISEMAN R. W., WESTERHOFF H. V. *et al.* The signal transduction function for oxidative phosphorylation is at least second order in ADP. *J Biol Chem*, 1996, 271, 45, 27995-27998.
- JORGENSEN S. B., RICHTER E. A. et WOJTASZEWSKI J. F. Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. *J Physiol*, 2006, 574, Pt 1, 17-31.
- JOUAVILLE L. S., PINTON P., BASTIANUTTO C. *et al.* Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96, 24, 13807-13812.
- KATZ A. M. Ernest Henry Starling, his predecessors, and the "Law of the Heart". *Circulation*, 2002, 106, 23, 2986-2992.
- KATZ L. A., SWAIN J. A., PORTMAN M. A. *et al.* Relation between phosphate metabolites and oxygen consumption of heart in vivo. *Am J Physiol*, 1989, 256, 1 Pt 2, H265-274.
- KAY L., NICOLAY K., WIERINGA B. *et al.* Direct evidence for the control of mitochondrial respiration by mitochondrial creatine kinase in oxidative muscle cells in situ. *J Biol Chem*, 2000, 275, 10, 6937-6944.
- KAY L., LI Z., MERICKSKAY M. *et al.* Study of regulation of mitochondrial respiration in vivo. An analysis of influence of ADP diffusion and possible role of cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1322, 1, 41-59.
- KIENS B., ESSEN-GUSTAVSSON B., CHRISTENSEN N. J. *et al.* Skeletal muscle substrate utilization during submaximal exercise in man: effect of endurance training. *J Physiol*, 1993, 469, 459-478.
- KLINGENBERG M. Mitochondria metabolite transport. *FEBS Lett*, 1970, 6, 3, 145-154.
- KLINGENBERG M. The state of ADP or ATP fixed to the mitochondria by bongkrekate. *Eur J Biochem*, 1976, 65, 2, 601-605.
- KLINGENBERG M. Transport catalysis. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1757, 9-10, 1229-1236.
- KLINGENBERG M. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1778, 10, 1978-2021.
- KO Y. H., HULLIHEN J., HONG S. *et al.* Mitochondrial F(0)F(1) ATP synthase. Subunit regions on the F1 motor shielded by F(0), Functional significance, and evidence for an involvement of the unique F(0) subunit F(6). *J Biol Chem*, 2000, 275, 42, 32931-32939.
- KO Y. H., DELANNOY M., HULLIHEN J. *et al.* Mitochondrial ATP synthasome. Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening assay yield dispersed single complexes containing the ATP synthase and carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem*, 2003, 278, 14, 12305-12309.
- KOBAYASHI K. et NEELY J. R. Control of maximum rates of glycolysis in rat cardiac muscle. *Circ Res*, 1979, 44, 2, 166-175.
- KOBAYASHI T. et SOLARO R. J. Calcium, thin filaments, and the integrative biology of cardiac contractility. *Annu Rev Physiol*, 2005, 67, 39-67.

- KORSMEYER S. J., WEI M. C., SAITO M. *et al.* Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ*, 2000, 7, 12, 1166-1173.
- KORZENIEWSKI B. Regulation of ATP supply during muscle contraction: theoretical studies. *Biochem J*, 1998, 330 (Pt 3), 1189-1195.
- KORZENIEWSKI B. Regulation of oxidative phosphorylation through parallel activation. *Biophys Chem*, 2007, 129, 2-3, 93-110.
- KORZENIEWSKI B., DESCHODT-ARSAC V., CALMETTES G. *et al.* Physiological heart activation by adrenaline involves parallel activation of ATP usage and supply. *Biochem J*, 2008, 413, 2, 343-347.
- KOTTKE M., WALLIMANN T. et BRDICZKA D. Dual electron microscopic localization of mitochondrial creatine kinase in brain mitochondria. *Biochem Med Metab Biol*, 1994, 51, 2, 105-117.
- KROGH A. et LINDHARD J. The Relative Value of Fat and Carbohydrate as Sources of Muscular Energy: With Appendices on the Correlation between Standard Metabolism and the Respiratory Quotient during Rest and Work. *Biochem J*, 1920, 14, 3-4, 290-363.
- KUSHMERICK M. J. et CONLEY K. E. Energetics of muscle contraction: the whole is less than the sum of its parts. *Biochem Soc Trans*, 2002, 30, 2, 227-231.
- KUSHMERICK M. J., MOERLAND T. S. et WISEMAN R. W. Mammalian skeletal muscle fibers distinguished by contents of phosphocreatine, ATP, and Pi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89, 16, 7521-7525.
- KUTSUZAWA T., SHIOYA S., KURITA D. *et al.* Muscle energy metabolism and nutritional status in patients with chronic obstructive pulmonary disease. A 31P magnetic resonance study. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995, 152, 2, 647-652.
- KUZNETSOV A. V., KHUCHUA Z. A., VASSILEVA E. V. *et al.* Heart mitochondrial creatine kinase revisited: the outer mitochondrial membrane is not important for coupling of phosphocreatine production to oxidative phosphorylation. *Arch Biochem Biophys*, 1989, 268, 1, 176-190.
- KUZNETSOV A. V., VEKSLER V., GELLERICH F. N. *et al.* Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc*, 2008, 3, 6, 965-976.
- KUZNETSOV A. V., TIIVEL T., SIKK P. *et al.* Striking differences between the kinetics of regulation of respiration by ADP in slow-twitch and fast-twitch muscles in vivo. *Eur J Biochem*, 1996, 241, 3, 909-915.
- LANDESBURG A. End-systolic pressure-volume relationship and intracellular control of contraction. *Am J Physiol*, 1996, 270, 1 Pt 2, H338-349.
- LENAZ G. et GENOVA M. L. Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 292, 4, C1221-1239.
- LI Y. P., SCHWARTZ R. J., WADDELL I. D. *et al.* Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha. *Faseb J*, 1998, 12, 10, 871-880.
- LIU T. et O'ROURKE B. Regulation of mitochondrial Ca(2+) and its effects on energetics and redox balance in normal and failing heart, *J Bioenerg Biomembr*, 2009, doi: 10.1007/s10863-009-9216-8.
- LODISH H, BALTIMORE D, BERK A *et al.* *Molecular Cell Biology*, 3rd, New York: Scientific American Books, Inc., 1995, 77.

- LOPEZ A. D., MATHERS C. D., EZZATI M. *et al.* Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet*, 2006a, 367, 9524, 1747-1757.
- LOPEZ A. D., SHIBUYA K., RAO C. *et al.* Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur Respir J*, 2006b, 27, 2, 397-412.
- LU Z., MOSS R. L. et WALKER J. W. Tension transients initiated by photogeneration of MgADP in skinned skeletal muscle fibers. *J Gen Physiol*, 1993, 101, 6, 867-888.
- MABUCHI K. et SRETER F. A. Actomyosin ATPase. I. Quantitative measurement of activity in cryostat sections. *Muscle Nerve*, 1980a, 3, 3, 227-232.
- MABUCHI K. et SRETER F. A. Actomyosin ATPase. II. Fiber typing by histochemical ATPase reaction. *Muscle Nerve*, 1980b, 3, 3, 233-239.
- MALTAIS F., LEBLANC P., SIMARD C. *et al.* Skeletal muscle adaptation to endurance training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 154, 2 Pt 1, 442-447.
- MALTAIS F., SULLIVAN M. J., LEBLANC P. *et al.* Altered expression of myosin heavy chain in the vastus lateralis muscle in patients with COPD. *Eur Respir J*, 1999, 13, 4, 850-854.
- MANITI O., LECOMPTE M. F., MARCILLAT O. *et al.* Mitochondrial creatine kinase binding to phospholipid monolayers induces cardiolipin segregation. *Biophys J*, 2009, 96, 6, 2428-2438.
- MARQUIS N. R. et FRITZ I. B. The Distribution of Carnitine, Acetylcarnitine, and Carnitine Acetyltransferase in Rat Tissues. *J Biol Chem*, 1965, 240, 2193-2196.
- MCCOMAS A. J. *Skeletal Muscle: Form and Function.*, Champaign, Illinois, USA: Human Kinetics Publishers, 1996, 400.
- MCCORMACK J. G., HALESTRAP A. P. et DENTON R. M. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev*, 1990, 70, 2, 391-425.
- MCDONALD K. S. et MOSS R. L. Osmotic compression of single cardiac myocytes eliminates the reduction in Ca²⁺ sensitivity of tension at short sarcomere length. *Circ Res*, 1995, 77, 1, 199-205.
- MCFARLAND E. W., KUSHMERICK M. J. et MOERLAND T. S. Activity of creatine kinase in a contracting mammalian muscle of uniform fiber type. *Biophys J*, 1994, 67, 5, 1912-1924.
- MCLEISH M. J. et KENYON G. L. In *Creatine Kinase: Using site-directed mutagenesis to elucidate structure and function in creatine kinase.* (Vial C.), Nova Science Publisher, New York, 2006, 27-68.
- MERRILL G. F., KURTH E. J., HARDIE D. G. *et al.* AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am J Physiol*, 1997, 273, 6 Pt 1, E1107-1112.
- MEYER L. E., MACHADO L. B., SANTIAGO A. P. *et al.* Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: antioxidant role of mitochondrial kinase-dependent ADP re-cycling activity. *J Biol Chem*, 2006, 281, 49, 37361-37371.
- MEYER R. A., SWEENEY H. L. et KUSHMERICK M. J. A simple analysis of the "phosphocreatine shuttle". *Am J Physiol*, 1984, 246, 5 Pt 1, C365-377.
- MITCHELL P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature*, 1961, 191, 144-148.
- MITCHELL P. Compartmentation and communication in living systems. Ligand conduction: a general catalytic principle in chemical, osmotic and chemiosmotic reaction systems. *Eur.J.Biochem.*, 1979, 95, 1-20.

- MITCHELL P. D. Foundations of vectorial metabolism and osmochemistry. *Biosci Rep*, 2004, 24, 4-5, 386-434; discussion 434-385.
- MIZUNO J., ARAKI J., MOHRI S. *et al.* Frank-Starling mechanism retains recirculation fraction of myocardial Ca(2+) in the beating heart. *Jpn J Physiol*, 2001, 51, 6, 733-743.
- MONGE C., BERAUD N., KUZNETSOV A. V. *et al.* Regulation of respiration in brain mitochondria and synaptosomes: restrictions of ADP diffusion in situ, roles of tubulin, and mitochondrial creatine kinase. *Mol Cell Biochem*, 2008, 318, 1-2, 147-165.
- MONGE C., BERAUD N., TEPP K. *et al.* Comparative analysis of the bioenergetics of adult cardiomyocytes and nonbeating HL-1 cells: respiratory chain activities, glycolytic enzyme profiles, and metabolic fluxes. *Can J Physiol Pharmacol*, 2009, 87, 4, 318-326.
- MOREL R. E. *et al.* Fleck G. Onsager's principle: A unifying bio-theme. *Journal of Theoretical Biology*, 1989, 136, 2, 171-175.
- NAKAE I., MITSUNAMI K., OMURA T. *et al.* Proton magnetic resonance spectroscopy can detect creatine depletion associated with the progression of heart failure in cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 42, 9, 1587-1593.
- NEELY J. *et al.* Morgan H. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annu. Rev. Physiology*, 1974, 63, 413 – 459.
- NEELY J. R., DENTON R. M., ENGLAND P. J. *et al.* The effects of increased heart work on the tricarboxylate cycle and its interactions with glycolysis in the perfused rat heart. *Biochem J*, 1972, 128, 1, 147-159.
- NEELY J. R., ROVETTO M. J., WHITMER J. T. *et al.* Effects of ischemia on function and metabolism of the isolated working rat heart. *Am J Physiol*, 1973, 225, 3, 651-658.
- NEUBAUER S. The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med*, 2007, 356, 11, 1140-1151.
- NEUMANN D., SCHLATTNER U. *et al.* Wallimann T. A molecular approach to the concerted action of kinases involved in energy homeostasis. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31, Pt 1, 169-174.
- NEWSHOLME E. A. *et al.* Start C. Regulation in Metabolism., London-New York-Sydney-Toronto: John Wiley&Sons Ltd., 1973, 364.
- NICHOLLS D. G. *et al.* Ferguson S. J. Bioenergetics 3, 3, New York, London: Academic Press, 2002, 297.
- NICOLAY K., ROJO M., WALLIMANN T. *et al.* The role of contact sites between inner and outer mitochondrial membrane in energy transfer. *Biochim Biophys Acta*, 1990, 1018, 2-3, 229-233.
- O'ROURKE B., CORTASSA S. *et al.* Aon M. A. Mitochondrial ion channels: gatekeepers of life and death. *Physiology (Bethesda)*, 2005, 20, 303-315.
- OGUT O. *et al.* Brozovich F. V. Creatine phosphate consumption and the actomyosin crossbridge cycle in cardiac muscles. *Circ Res*, 2003, 93, 1, 54-60.
- OLIVEIRA P. J. *et al.* Wallace K. B. Depletion of adenine nucleotide translocator protein in heart mitochondria from doxorubicin-treated rats--relevance for mitochondrial dysfunction. *Toxicology*, 2006, 220, 2-3, 160-168.
- OLIVEIRA P. J., SANTOS M. S. *et al.* Wallace K. B. Doxorubicin-induced thiol-dependent alteration of cardiac mitochondrial permeability transition and respiration. *Biochemistry (Mosc)*, 2006, 71, 2, 194-199.
- OMOTE H., SAMBONMATSU N., SAITO K. *et al.* The gamma-subunit rotation and torque generation in F1-ATPase from wild-type or uncoupled mutant *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96, 14, 7780-7784.

- ORAM J. F., BENNETCH S. L. et NEELY J. R. Regulation of fatty acid utilization in isolated perfused rat hearts. *J Biol Chem*, 1973, 248, 15, 5299-5309.
- OTTENHEIJM C. A., HEUNKS L. M. et DEKHUIJZEN R. P. Diaphragm adaptations in patients with COPD. *Respir Res*, 2008, 9, 12.
- OVADI J. et SRERE P. A. Macromolecular compartmentation and channeling. *Int Rev Cytol*, 2000, 192, 255-280.
- PARK H., KAUSHIK V. K., CONSTANT S. *et al.* Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. *J Biol Chem*, 2002, 277, 36, 32571-32577.
- PASSONNEAU J. V. et LOWRY O. H. The role of phosphofructokinase in metabolic regulation. *Adv Enzyme Regul*, 1964, 2, 265-274.
- PEBAY-PEYROULA E. et BRANDOLIN G. Nucleotide exchange in mitochondria: insight at a molecular level. *Curr Opin Struct Biol*, 2004, 14, 4, 420-425.
- PEBAY-PEYROULA E., DAHOUT-GONZALEZ C., KAHN R. *et al.* Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature*, 2003, 426, 6962, 39-44.
- PEDERSEN P. L. Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J Bioenerg Biomembr*, 2007a, 39, 3, 211-222.
- PEDERSEN P. L. Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J Bioenerg Biomembr*, 2007b, 39, 5-6, 349-355.
- PEDERSEN P. L. Voltage dependent anion channels (VDACs): a brief introduction with a focus on the outer mitochondrial compartment's roles together with hexokinase-2 in the "Warburg effect" in cancer. *J Bioenerg Biomembr*, 2008, 40, 3, 123-126.
- PEDERSEN P. L., KO Y. H. et HONG S. ATP synthases in the year 2000: evolving views about the structures of these remarkable enzyme complexes. *J Bioenerg Biomembr*, 2000, 32, 4, 325-332.
- PELIKAN P. C., GERSTENBLITH G., VANDEGAER K. *et al.* Absence of acute doxorubicin-induced dysfunction of heart mitochondrial oxidative phosphorylation and creatine kinase activities. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1988, 188, 1, 7-16.
- PELLOUX S., ROBILLARD J., FERRERA R. *et al.* Non-beating HL-1 cells for confocal microscopy: application to mitochondrial functions during cardiac preconditioning. *Prog Biophys Mol Biol*, 2006, 90, 1-3, 270-298.
- PEREIRA SANT'ANA J. A., ENNION S., SARGEANT A. J. *et al.* Comparison of the molecular, antigenic and ATPase determinants of fast myosin heavy chains in rat and human: a single-fibre study. *Pflugers Arch*, 1997, 435, 1, 151-163.
- PIPINOS, II, SHEPARD A. D., ANAGNOSTOPOULOS P. V. *et al.* Phosphorus 31 nuclear magnetic resonance spectroscopy suggests a mitochondrial defect in claudicating skeletal muscle. *J Vasc Surg*, 2000, 31, 5, 944-952.
- PONSOT E., DUFOUR S. P., ZOLL J. *et al.* Exercise training in normobaric hypoxia in endurance runners. II. Improvement of mitochondrial properties in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 2006, 100, 4, 1249-1257.
- POUW E. M., SCHOLS A. M., VAN DER VUSSE G. J. *et al.* Elevated inosine monophosphate levels in resting muscle of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157, 2, 453-457.

- PRIGOGINE I. et NICOLIS G. Self-Organization in Nonequilibrium Systems: From Dissipative Structures to Order through Fluctuations., New York: John Wiley & Sons Inc., 1977, 512.
- PUCAR D., DZEJA P. P., BAST P. *et al.* Cellular energetics in the preconditioned state: protective role for phosphotransfer reactions captured by ^{18}O -assisted ^{31}P NMR. *J Biol Chem*, 2001, 276, 48, 44812-44819.
- RANDLE P. J. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev*, 1998, 14, 4, 263-283.
- RESZKO A. E., KASUMOV T., DAVID F. *et al.* Regulation of malonyl-CoA concentration and turnover in the normal heart. *J Biol Chem*, 2004, 279, 33, 34298-34301.
- RODEN M. How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle. *News Physiol Sci*, 2004, 19, 92-96.
- ROSTOVTSEVA T. et COLOMBINI M. VDAC channels mediate and gate the flow of ATP: implications for the regulation of mitochondrial function. *Biophys J*, 1997, 72, 5, 1954-1962.
- ROSTOVTSEVA T. K. et BEZRUKOV S. M. VDAC regulation: role of cytosolic proteins and mitochondrial lipids. *J Bioenerg Biomembr*, 2008, 40, 3, 163-170.
- ROSTOVTSEVA T. K., SHELDON K. L., HASSANZADEH E. *et al.* Tubulin binding blocks mitochondrial voltage-dependent anion channel and regulates respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105, 48, 18746-18751.
- SAKS V., BERAUD N. et WALLIMANN T. Metabolic compartmentation - a system level property of muscle cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2008, 9, 751-767.
- SAKS V., MONGE C. et GUZUN R. Philosophical basis and some historical aspects of systems biology: from hegel to noble - applications for bioenergetic research. *Int J Mol Sci*, 2009, 10, 3, 1161-1192.
- SAKS V., DOS SANTOS P., GELLERICH F. N. *et al.* Quantitative studies of enzyme-substrate compartmentation, functional coupling and metabolic channelling in muscle cells. *Mol Cell Biochem*, 1998a, 184, 1-2, 291-307.
- SAKS V., MONGE C., ANMANN T. *et al.* In *Molecular System Bioenergetics. Energy for Life: Integrated and Organized Cellular Energetic Systems: Theories of Cell Energetics, Compartmentation and Metabolic Channeling* (Saks V.), Wiley-VCH: Weinheim, GmbH, Germany, 2007a, 59-110.
- SAKS V., FAVIER R., GUZUN R. *et al.* Molecular system bioenergetics: regulation of substrate supply in response to heart energy demands. *J Physiol*, 2006a, 577, Pt 3, 769-777.
- SAKS V., DZEJA P., SCHLATTNER U. *et al.* Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law. *J Physiol*, 2006b, 571, Pt 2, 253-273.
- SAKS V., ANMANN T., GUZUN R. *et al.* Creatine and Creatine Kinase in Health and Disease: The Creatine Kinase Phosphotransfer Network: Thermodynamic and Kinetic Considerations, the Impact of the Mitochondrial Outer Membrane and Modelling Approaches. (Wyss M. and Salomons G.), Springer, Dordrecht, 2007b, 27-66.
- SAKS V., KAAMBRE T., GUZUN R. *et al.* The creatine kinase phosphotransfer network: thermodynamic and kinetic considerations, the impact of the mitochondrial outer membrane and modelling approaches. *Subcell Biochem*, 2007c, 46, 27-65.
- SAKS V. A. et ALIEV M. K. Is there the creatine kinase equilibrium in working heart cells? *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 227, 2, 360-367.
- SAKS V. A., BELIKOVA Y. O. et KUZNETSOV A. V. In vivo regulation of mitochondrial respiration in cardiomyocytes: specific restrictions for intracellular diffusion of ADP. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1074, 2, 302-311.

- SAKS V. A., VENTURA-CLAPIER R. et ALIEV M. K. Metabolic control and metabolic capacity: two aspects of creatine kinase functioning in the cells. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1274, 3, 81-88.
- SAKS V. A., CHERNOUSOVA G. B., VORONKOV, II *et al.* Study of energy transport mechanism in myocardial cells. *Circ Res*, 1974, 35 Suppl 3, 138-149.
- SAKS V. A., CHERNOUSOVA G. B., GUKOVSKY D. E. *et al.* Studies of energy transport in heart cells. Mitochondrial isoenzyme of creatine phosphokinase: kinetic properties and regulatory action of Mg²⁺ ions. *Eur J Biochem*, 1975, 57, 1, 273-290.
- SAKS V. A., KHUCHUA Z. A., VASILYEVA E. V. *et al.* Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration - a synthesis. *Mol Cell Biochem*, 1994, 133-134, 155-192.
- SAKS V. A., VENDELIN M., ALIEV M. K. *et al.* Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Mechanisms and Modeling of Energy Transfer Between and Among Intracellular Compartments (Dienel G. and Gibson G.), Springer Science and Business Media, New York-Boston, USA, 2007d, 815-860.
- SAKS V. A., KUZNETSOV A. V., VENDELIN M. *et al.* Functional coupling as a basic mechanism of feedback regulation of cardiac energy metabolism. *Mol Cell Biochem*, 2004, 256-257, 1-2, 185-199.
- SAKS V. A., VASIL'EVA E., BELIKOVA YU O. *et al.* Retarded diffusion of ADP in cardiomyocytes: possible role of mitochondrial outer membrane and creatine kinase in cellular regulation of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1144, 2, 134-148.
- SAKS V. A., DZEJA P., GUZUN R. *et al.* In Molecular System Bioenergetics. Energy for Life: System analysis of cardiac energetics – excitation –contraction coupling: integration of mitochondrial respiration, phosphotransfer pathways, metabolic pacing and substrate supply in the heart (Saks V.), Wiley –VCH, Weinheim, GmbH, Germany, 2007e, 367 – 405.
- SAKS V. A., VEKSLER V. I., KUZNETSOV A. V. *et al.* Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. *Mol Cell Biochem*, 1998b, 184, 1-2, 81-100.
- SAKS V. A., KAAMBRE T., SIKK P. *et al.* Intracellular energetic units in red muscle cells. *Biochem J*, 2001, 356, Pt 2, 643-657.
- SATTA A., MIGLIORI G. B., SPANEVELLO A. *et al.* Fibre types in skeletal muscles of chronic obstructive pulmonary disease patients related to respiratory function and exercise tolerance. *Eur Respir J*, 1997, 10, 12, 2853-2860.
- SCHIAFFINO S. et REGGIANI C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev*, 1996, 76, 2, 371-423.
- SCHLAME M. et HOSTETLER K. Y. Cardiolipin synthase from mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1348, 1-2, 207-213.
- SCHLATTNER U. et WALLIMANN T. In Encyclopedia of Biological Chemistry: Metabolite channeling: creatine kinase microcompartments. (Lennarz W. J. and Lane M. D.), Academic Press, New York, USA, 2004, 646-651.
- SCHLATTNER U., TOKARSKA-SCHLATTNER M. et WALLIMANN T. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 2006a, 1762, 2, 164-180.
- SCHLATTNER U., TOKARSKA-SCHLATTNER M. et WALLIMANN T. In Creatine kinase: Molecular structure and function of mitochondrial creatine kinases (Vial C.), Nova Science Publishers, New York, 2006b, 123-170.

- SCHLATTNER U., DOLDER M., WALLIMANN T. *et al.* Mitochondrial creatine kinase and mitochondrial outer membrane porin show a direct interaction that is modulated by calcium. *J Biol Chem*, 2001, 276, 51, 48027-48030.
- SCHLATTNER U., FORSTNER M., EDER M. *et al.* Functional aspects of the X-ray structure of mitochondrial creatine kinase: a molecular physiology approach. *Mol Cell Biochem*, 1998, 184, 1-2, 125-140.
- SCHLATTNER U., GEHRING F., VERNOUX N. *et al.* C-terminal lysines determine phospholipid interaction of sarcomeric mitochondrial creatine kinase. *J Biol Chem*, 2004, 279, 23, 24334-24342.
- SCHONEKESS B. O. et LOPASCHUK G. D. In *The Carnitine System: A New Therapeutical Approach to Cardiovascular Diseases.: The effects of carnitine on myocardial carbohydrate metabolism.* (Dejong J. W. and Ferrari R.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1995, 39-52.
- SCHWARZER C., BARNIKOL-WATANABE S., THINNES F. P. *et al.* Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) interacts with the dynein light chain Tctex1 and the heat-shock protein PBP74. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002, 34, 9, 1059-1070.
- SELIVANOV V. A., ALEKSEEV A. E., HODGSON D. M. *et al.* Nucleotide-gated KATP channels integrated with creatine and adenylate kinases: amplification, tuning and sensing of energetic signals in the compartmentalized cellular environment. *Mol Cell Biochem*, 2004, 256-257, 1-2, 243-256.
- SEPPET E. K., KAAMBRE T., SIKK P. *et al.* Functional complexes of mitochondria with Ca,MgATPases of myofibrils and sarcoplasmic reticulum in muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1504, 2-3, 379-395.
- SHIMIZU J., TODAKA K. et BURKHOF D. Load dependence of ventricular performance explained by model of calcium-myofilament interactions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 282, 3, H1081-1091.
- SIEMANKOWSKI R. F. et WHITE H. D. Kinetics of the interaction between actin, ADP, and cardiac myosin-S1. *J Biol Chem*, 1984, 259, 8, 5045-5053.
- SMITH S. A., MONTAIN S. J., ZIENTARA G. P. *et al.* Use of phosphocreatine kinetics to determine the influence of creatine on muscle mitochondrial respiration: an in vivo ³¹P-MRS study of oral creatine ingestion. *J Appl Physiol*, 2004, 96, 6, 2288-2292.
- SOLARO R. J. et RARICK H. M. Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circ Res*, 1998, 83, 5, 471-480.
- SOUID A. K., PENEFSKY H. S., SADOWITZ P. D. *et al.* Enhanced cellular respiration in cells exposed to doxorubicin. *Mol Pharm*, 2006, 3, 3, 307-321.
- SPEER O., BACK N., BUERKLEN T. *et al.* Octameric mitochondrial creatine kinase induces and stabilizes contact sites between the inner and outer membrane. *Biochem J*, 2005, 385, Pt 2, 445-450.
- SPINDLER M., ILLING B., HORN M. *et al.* Temporal fluctuations of myocardia high-energy phosphate metabolite with the cardiac cycle. *Basic Res Cardiol*, 2001, 96, 6, 553-556.
- STANLEY W. C., RECCHIA F. A. et LOPASCHUK G. D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*, 2005, 85, 3, 1093-1129.
- STOCKER A., KEIS S., VONCK J. *et al.* The structural basis for unidirectional rotation of thermoalkaliphilic F1-ATPase. *Structure*, 2007, 15, 8, 904-914.
- TAEGETMEYER H., WILSON C. R., RAZEGHI P. *et al.* Metabolic energetics and genetics in the heart. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1047, 208-218.
- TAO Z., JONES E., GOODISMAN J. *et al.* Quantitative measure of cytotoxicity of anticancer drugs and other agents. *Anal Biochem*, 2008, 381, 1, 43-52.

- TAO Z., WITHERS H. G., PENEFSKY H. S. *et al.* Inhibition of cellular respiration by doxorubicin. *Chem Res Toxicol*, 2006, 19, 8, 1051-1058.
- TEN HOVE M. et NEUBAUER S. MR spectroscopy in heart failure--clinical and experimental findings. *Heart Fail Rev*, 2007, 12, 1, 48-57.
- TERRITO P. R., FRENCH S. A. et BALABAN R. S. Simulation of cardiac work transitions, in vitro: effects of simultaneous Ca²⁺ and ATPase additions on isolated porcine heart mitochondria. *Cell Calcium*, 2001a, 30, 1, 19-27.
- TERRITO P. R., FRENCH S. A., DUNLEAVY M. C. *et al.* Calcium activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: rapid kinetics of mVO₂, NADH, AND light scattering. *J Biol Chem*, 2001b, 276, 4, 2586-2599.
- TESI C., COLOMO F., NENCINI S. *et al.* The effect of inorganic phosphate on force generation in single myofibrils from rabbit skeletal muscle. *Biophys J*, 2000, 78, 6, 3081-3092.
- TIAN R. et INGWALL J. S. Energetic basis for reduced contractile reserve in isolated rat hearts. *Am J Physiol*, 1996, 270, 4 Pt 2, H1207-1216.
- TIAN R., HALOW J. M., MEYER M. *et al.* Thermodynamic limitation for Ca²⁺ handling contributes to decreased contractile reserve in rat hearts. *Am J Physiol*, 1998, 275, 6 Pt 2, H2064-2071.
- TIMOHINA N., GUZUN R., TEPP K. *et al.* Direct measurement of energy fluxes from mitochondria into cytoplasm in permeabilized cardiac cells *in situ*: some evidence for mitochondrial interactosome, 2009, unpublished.
- TOKARSKA-SCHLATTNER M., WALLIMANN T. et SCHLATTNER U. Multiple interference of anthracyclines with mitochondrial creatine kinases: preferential damage of the cardiac isoenzyme and its implications for drug cardiotoxicity. *Mol Pharmacol*, 2002, 61, 3, 516-523.
- TOKARSKA-SCHLATTNER M., DOLDER M., GERBER I. *et al.* Reduced creatine-stimulated respiration in doxorubicin challenged mitochondria: particular sensitivity of the heart. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1767, 11, 1276-1284.
- TRAN K., SMITH N. P., LOISELLE D. S. *et al.* A thermodynamic model of the cardiac sarcoplasmic/endoplasmic Ca(2+) (SERCA) pump. *Biophys J*, 2009, 96, 5, 2029-2042.
- TROMBITAS K. et GRANZIER H. Actin removal from cardiac myocytes shows that near Z line titin attaches to actin while under tension. *Am J Physiol*, 1997, 273, 2 Pt 1, C662-670.
- VAN BEEK J. H. Adenine nucleotide-creatine-phosphate module in myocardial metabolic system explains fast phase of dynamic regulation of oxidative phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 293, 3, C815-829.
- VAN DEURSEN J., HEERSCHAP A., OERLEMANS F. *et al.* Skeletal muscles of mice deficient in muscle creatine kinase lack burst activity. *Cell*, 1993, 74, 4, 621-631.
- VAN GELDER B. On cytochrome c oxidase. I. The extinction coefficients of cytochrome a and cytochrome a₃. *Biochim Biophys Acta*, 1966, 118, 1, 36-46.
- VANDER HEIDEN M. G., LI X. X., GOTTLEIB E. *et al.* Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, 2001, 276, 22, 19414-19419.
- VEKSLER V. I., KUZNETSOV A. V., ANFLOUS K. *et al.* Muscle creatine kinase-deficient mice. II. Cardiac and skeletal muscles exhibit tissue-specific adaptation of the mitochondrial function. *J Biol Chem*, 1995, 270, 34, 19921-19929.
- VENDELIN M., KONGAS O. et SAKS V. Regulation of mitochondrial respiration in heart cells analyzed by reaction-diffusion model of energy transfer. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 278, 4, C747-764.

- VENDELIN M., LEMBA M. et SAKS V. A. Analysis of functional coupling: mitochondrial creatine kinase and adenine nucleotide translocase. *Biophys J*, 2004a, 87, 1, 696-713.
- VENDELIN M., BOVENDEERD P. H., ENGELBRECHT J. *et al.* Optimizing ventricular fibers: uniform strain or stress, but not ATP consumption, leads to high efficiency. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 283, 3, H1072-1081.
- VENDELIN M., BERAUD N., GUERRERO K. *et al.* Mitochondrial regular arrangement in muscle cells: a "crystal-like" pattern. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 288, 3, C757-767.
- VENDELIN M., EIMRE M., SEPPET E. *et al.* Intracellular diffusion of adenosine phosphates is locally restricted in cardiac muscle. *Mol Cell Biochem*, 2004b, 256-257, 1-2, 229-241.
- VENTURA-CLAPIER R., KUZNETSOV A., VEKSLER V. *et al.* Functional coupling of creatine kinases in muscles: species and tissue specificity. *Mol Cell Biochem*, 1998, 184, 1-2, 231-247.
- VENTURA-CLAPIER R., KUZNETSOV A. V., D'ALBIS A. *et al.* Muscle creatine kinase-deficient mice. I. Alterations in myofibrillar function. *J Biol Chem*, 1995, 270, 34, 19914-19920.
- VIBERT P., CRAIG R. et LEHMAN W. Steric-model for activation of muscle thin filaments. *J Mol Biol*, 1997, 266, 1, 8-14.
- VONCK J. et SCHAFFER E. Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793, 1, 117-124.
- VOORRIPS L. E., RAVELLI A. C., DONGELMANS P. C. *et al.* A physical activity questionnaire for the elderly. *Med Sci Sports Exerc*, 1991, 23, 8, 974-979.
- VYSSOKIKH M. Y. et BRDICZKA D. The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. *Acta Biochim Pol*, 2003, 50, 2, 389-404.
- WALLIMANN T., WYSS M., BRDICZKA D. *et al.* Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J*, 1992, 281 (Pt 1), 21-40.
- WALLIMANN T., TOKARSKA-SCHLATTNER M., NEUMANN D. *et al.* In *Molecular System Bioenergetics. Energy for Life: The Phosphocreatine Circuit: Molecular and Cellular Physiology of Creatine Kinases, Sensitivity to Free Radicals, and Enhancement by Creatine Supplementation.* (Saks V.), Wiley-VCH: Weinheim, GmbH, Germany, 2007, 195-264.
- WALSH B., TONKONOJI M., SODERLUND K. *et al.* The role of phosphorylcreatine and creatine in the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *J Physiol*, 2001, 537, Pt 3, 971-978.
- WALSH B., HOOKS R. B., HORNYAK J. E. *et al.* Enhanced mitochondrial sensitivity to creatine in rats bred for high aerobic capacity. *J Appl Physiol*, 2006, 100, 6, 1765-1769.
- WARBURG O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 1956, 124, 3215, 269-270.
- WEGMANN G., ZANOLLA E., EPPENBERGER H. M. *et al.* In situ compartmentation of creatine kinase in intact sarcomeric muscle: the acto-myosin overlap zone as a molecular sieve. *J Muscle Res Cell Motil*, 1992, 13, 4, 420-435.
- WEGMANN G., HUBER R., ZANOLLA E. *et al.* Differential expression and localization of brain-type and mitochondrial creatine kinase isoenzymes during development of the

- chicken retina: Mi-CK as a marker for differentiation of photoreceptor cells. *Differentiation*, 1991, 46, 2, 77-87.
- WEISS R. G., GERSTENBLITH G. et BOTTOMLEY P. A. ATP flux through creatine kinase in the normal, stressed, and failing human heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102, 3, 808-813.
- WHITTOM F., JOBIN J., SIMARD P. M. *et al.* Histochemical and morphological characteristics of the vastus lateralis muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Med Sci Sports Exerc*, 1998, 30, 10, 1467-1474.
- WIENER N. *Cybernetics or Control and Communication in the Animal and the Machine.*, Second Edition, Cambridge, Massachusetts: The MIT Press, 1965, 212.
- WILLIAMSON J. R. Mitochondrial function in the heart. *Annu Rev Physiol*, 1979, 41, 485-506.
- WILLIAMSON J. R., FORD C., ILLINGWORTH J. *et al.* Coordination of citric acid cycle activity with electron transport flux. *Circ Res*, 1976, 38, 5 Suppl 1, I39-51.
- WINDER W. W. et HARDIE D. G. Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am J Physiol*, 1996, 270, 2 Pt 1, E299-304.
- WONG A. W., GAN W. Q., BURNS J. *et al.* Acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: influence of social factors in determining length of hospital stay and readmission rates. *Can Respir J*, 2008, 15, 7, 361-364.
- WU F. et BEARD D. A. Roles of the Creatine Kinase System and Myoglobin in Maintaining Energetic State in the Working Heart, *BMC Syst Biol*, 2009, doi:10.1186/1752-0509-3-22.
- WU F., ZHANG J. et BEARD D. A. Experimentally observed phenomena on cardiac energetics in heart failure emerge from simulations of cardiac metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009,
- WU F., ZHANG E. Y., ZHANG J. *et al.* Phosphate metabolite concentrations and ATP hydrolysis potential in normal and ischaemic hearts. *J Physiol*, 2008, 586, Pt 17, 4193-4208.
- WUYAM B., PAYEN J. F., LEVY P. *et al.* Metabolism and aerobic capacity of skeletal muscle in chronic respiratory failure related to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 1992, 5, 2, 157-162.
- WYSS M., SMEITINK J., WEVERS R. A. *et al.* Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1102, 2, 119-166.
- XU C., CRAIG R., TOBACMAN L. *et al.* Tropomyosin positions in regulated thin filaments revealed by cryoelectron microscopy. *Biophys J*, 1999, 77, 2, 985-992.
- XU X., FORBES J. G. et COLOMBINI M. Actin modulates the gating of *Neurospora crassa* VDAC. *J Membr Biol*, 2001, 180, 1, 73-81.
- YANIV Y., STANLEY W. C., SAIDEL G. M. *et al.* The role of Ca²⁺ in coupling cardiac metabolism with regulation of contraction: in silico modeling. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1123, 69-78.
- YENDE S., WATERER G. W., TOLLEY E. A. *et al.* Inflammatory markers are associated with ventilatory limitation and muscle dysfunction in obstructive lung disease in well functioning elderly subjects. *Thorax*, 2006, 61, 1, 10-16.
- ZELEZNIKAR R. J., DZEJA P. P. et GOLDBERG N. D. Adenylate kinase-catalyzed phosphoryl transfer couples ATP utilization with its generation by glycolysis in intact muscle. *J Biol Chem*, 1995, 270, 13, 7311-7319.
- ZOLL J., PONSOT E., DUFOUR S. *et al.* Exercise training in normobaric hypoxia in endurance runners. III. Muscular adjustments of selected gene transcripts. *J Appl Physiol*, 2006, 100, 4, 1258-1266.

- ZOLL J., N'GUESSAN B., RIBERA F. *et al.* Preserved response of mitochondrial function to short-term endurance training in skeletal muscle of heart transplant recipients. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 42, 1, 126-132.
- ZOLL J., SANCHEZ H., N'GUESSAN B. *et al.* Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *J Physiol*, 2002, 543, Pt 1, 191-200.
- ZWEIER J. L., JACOBUS W. E., KORECKY B. *et al.* Bioenergetic consequences of cardiac phosphocreatine depletion induced by creatine analogue feeding. *J Biol Chem*, 1991, 266, 30, 20296-20304.

PUBLICATIONS (voir annexe)