



**HAL**  
open science

# Déterminants mitochondriaux de l'oxydation des acides gras : modulation par l'entraînement, l'hypoxie et un agoniste PPAR- $\delta$

Alexandra Malgoyre

► **To cite this version:**

Alexandra Malgoyre. Déterminants mitochondriaux de l'oxydation des acides gras : modulation par l'entraînement, l'hypoxie et un agoniste PPAR- $\delta$ . Pharmacologie. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GREN013 . tel-00624381

**HAL Id: tel-00624381**

**<https://theses.hal.science/tel-00624381>**

Submitted on 16 Sep 2011

**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 DE GRENOBLE

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : « **Physiologie Physiopathologies Pharmacologie** »

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par **Alexandra HENRIONNET-MALGOYRE**

Thèse dirigée par **M. le professeur Xavier BIGARD**

préparée au sein de l'Unité de Physiologie des Activités Militaires,  
Institut de Recherche Biomédicale des Armées.  
École Doctorale Sciences et Chimie du Vivant

# Déterminants mitochondriaux de l'oxydation des acides gras : modulation par l'entraînement, l'hypoxie et un agoniste PPAR- $\delta$

Thèse soutenue publiquement le 27 avril 2011,  
devant le jury composé de :

**Mme Carina Prip Buus**

DR2 CNRS, UMR 8104, Paris (rapporteur)

**Mme Dominique Desplanches**

CR1 CNRS, UMR 5123, Lyon (rapporteur)

**Mme Renée Ventura Clapier**

DR1 CNRS, INSERM U769, Châtenay Malabry (membre)

**M. Daniel Rivière**

Professeur des universités, praticien hospitalier, CHU Toulouse (membre)

**M. Henri Benoit**

Professeur des universités, laboratoire HP2, Grenoble (membre)

**M. Xavier Bigard**

Professeur Agrégé du Val de Grâce, IRBA Brétigny/Orge (directeur de thèse)



***Je tiens à remercier :***

M. X. BIGARD de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour réaliser ce travail, de m'avoir fait partager son goût pour la recherche, et de m'avoir toujours encouragée à donner le meilleur de moi-même. Je veux aussi le remercier pour la bonne humeur, et les encouragements continuels dont il a fait preuve tout au long de ma thèse.

Mme N. KOULMANN pour l'ensemble de ses précieux conseils et de son soutien tout au long de la réalisation de mon travail de thèse.

Mme R. VENTURA-CLAPIER pour nos échanges toujours fructueux et remplis d'optimisme, mais aussi pour avoir accepté d'examiner cette thèse.

Mme C. PRIP BUUS d'avoir accepté de juger cette thèse et d'en être le rapporteur.

Mme D. DESPLANCHES d'avoir accepté de juger cette thèse et d'en être le rapporteur.

M. D. RIVIERE d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

M. H. BENOIT d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

Tous les membres de l'unité de l'unité de Physiologie des Activités Physiques Militaires de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées, dont l'aide, le soutien et la bonne humeur m'auront permis de mener à bien cette thèse.

Hervé sans qui, je ne serais jamais arrivée au bout de cette thèse. Bien sûr pour ton aide dans les manip mais plus encore pour la confiance que tu m'as toujours témoigné. Tu as cru en moi au moment où je n'y croyais plus moi-même. Si tu as déjà remporté de belles victoires dans le coaching sportif, tu as réussi à me donner confiance et cela est un bien inestimable. J'ai petit à petit appris à marcher avec toi mais j'espère que nous ferons encore un bout de chemin ensemble. Soit ici remercié pour ta patience, ta bienveillance, tes conseils et ton humour.

Julia, cette année passée ensemble a été une bouffée d'oxygène. Je serai toujours en admiration devant ta capacité à oser, à te lancer dans des combats qui paraissaient pourtant perdus d'avance.

Thomas, outre tes coups de mains précieux; je sais que maintenant mes questionnements parfois incongrus sont au moins partagés par une personne sur terre. A toi de jouer maintenant mais le résultat ne fait aucun doute pour moi.

Nadine, malgré les inquiétudes actuelles, tu as toujours répondu présente à chaque fois que j'avais besoin d'aide.

Bernard, tu m'as fait découvrir les dosages d'activités enzymatiques, toujours soulagée pour

le travail ingrat des commandes mais surtout tu as été une épaule sur laquelle m'appuyer, verser une larme et sans jamais être jugée.

Sébastien, ton ironie m'a parfois déstabilisée mais tu m'as aussi fait comprendre que la confiance en soi était à trouver en soi et pas dans le regard des autres.

Rachel, qui m'a initiée au travail de laboratoire au moment où une pipette était pour moi un outil au maniement inconnu. Que de chemin parcouru depuis...

Adélie, ton sens de l'esprit collectif est un vrai bonheur pour une équipe.

Corinne, qui s'est toujours proposée pour les coups de main même les plus rébarbatifs.

Clovis et Alexandre, nos étudiants de master 2 avec lesquels j'ai découvert les joies de l'encadrement.

Toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin afin de mener à terme ma thèse.

André, dont le bureau m'a toujours été ouvert. Merci pour tes interrogations, tes idées, tes discussions sur les enfants... J'espère continuer à travailler longtemps avec toi.

Antonia, tu as toujours pris soin de moi dans les moments difficiles. Soit ici remerciée pour ton empathie spontanée et profonde.

Josiane, la travailleuse de l'ombre mais sans qui nos dosages de routine seraient irréalisables.

Les relecteurs qui se sont proposés et Patrick que j'ai sollicité largement et qui a toujours répondu malgré des délais plus qu'indécents.

Mon mari et mes enfants qui ont été particulièrement patients durant cette période de rédaction. Merci pour la sérénité que vous avez instaurée et sans laquelle un tel travail aurait été impossible. Votre tolérance a été grande et votre intolérance m'a permis de retrouver la clairvoyance nécessaire dans ce travail où l'on pourrait se perdre. Restez toujours ce garde-fou.

***A mes parents.***  
***A papi Raymond.***

## RESUME

**Mots clés :** muscle squelettique, mitochondrie, acide gras longue chaîne, agoniste PPAR- $\delta$ , hypoxie, entraînement aérobie.

La plasticité mitochondriale à l'égard de l'oxydation de substrats, et sa participation à la transition métabolique ont été étudiées dans deux conditions: l'exposition chronique à l'hypoxie et l'entraînement en endurance, connues comme modulatrices de la préférence de substrats.

Ainsi l'affinité pour le palmitoyl carnitine est augmentée par l'hypoxie et la restriction calorique alors qu'au contraire le flux maximal de palmitoyl CoA (PCoA) semble freiné par l'hypoxie. Quant aux effets de l'entraînement, malgré une amélioration du temps limite de course à intensité sous-maximale et une augmentation des capacités oxydatives globales, nous ne retrouvons pas de facilitation de l'oxydation du PCoA.

Par ailleurs, on observe une augmentation des messagers PPAR- $\delta$  et d'UCP-3 en réponse à une exposition aigüe à l'hypoxie. Le rôle de PPAR- $\delta$  sur la modulation de l'utilisation de substrats par la mitochondrie a aussi été envisagé en utilisant un agoniste pharmacologique de PPAR- $\delta$ , le GW 742. Celui-ci, permet d'améliorer l'efficacité catalytique du complexe enzymatique CPT-1 tout en limitant l'oxydation du pyruvate, également diminuée dans les muscles oxydatifs au cours de la restriction calorique. Le traitement par GW, s'il limite l'altération de l'efficacité catalytique de CPT-1 observée en hypoxie, ne permet pas de rétablir, un niveau d'oxydation en PCoA similaire à celui observé en situation contrôle. Le GW 742 s'est aussi montré capable de restaurer le flux en PCoA altéré par l'entraînement, même si la fonction du transport CPT-1 reste limitante devant l'augmentation du potentiel oxydatif induit par l'entraînement. Par ailleurs, nous n'avons pas retrouvé de relation étroite entre les variations d'affinité en PCoA et la performance aérobie sous-maximale, pourtant influencée par la capacité à oxyder préférentiellement les lipides.

Enfin, la diminution du flux en pyruvate associée à l'augmentation de l'utilisation des acides gras à longue chaîne observée lors du traitement par GW 742 ou au cours de la restriction calorique pose la question du rôle joué par une cible particulière de PPAR- $\delta$  sur la mitochondrie, la protéine découplante UCP-3.

## ABSTRACT

**Key words** : Skeletal muscle, mitochondria, long chain fatty acid, PPAR- $\delta$  agonist, hypoxia, endurance training.

Substrate oxidation and its contribution to metabolic shift, as markers of muscle plasticity have been studied under two specific condition, the prolonged exposure to ambient hypoxia, and endurance training, two conditions known as leading to changes in substrate use.

Our result show that the affinity for palmitoyl carnitine is increased by both hypoxia and food restriction, whereas in contrast exposure to hypoxia slow down the palmitoyl CoA (PCoA) maximal use. On the other hand, endurance training led to enhanced physical performance and increased muscular oxidative capacities, but failed to enhance PCoA oxidation.

The transcripts for PPAR- $\delta$  and UCP-3 increased in response to acute exposure to hypoxia. Moreover, we studied the role played by PPAR- $\delta$  on the substrate use modulation, using new PPAR- $\delta$  agonist known as GW 742. In the present study, this new pharmacological substance has been shown to enhance the catalytic efficiency of CPT-1 and decrease the pyruvate oxidation. Moreover, GW 742 administration limits the hypoxia-induced decrease of CPT-1 activity, but failed to recover levels of PCoA oxidation similar to those observed in control conditions. GW 742 administration was able to suppress the effects of training on maximal PCoA oxidation, even if the functional CPT-1 activity remains limiting regarding the training-induced increase in oxidative capacity. On the other hand, we failed to show strong relationship between PCoA affinity and physical performance.

Finally, the concomitant increase in long chain fatty acid oxidation and decrease in pyruvate oxidation resulting from either GW 742 use or food restriction, addresses the issue of the role played by the uncoupling protein UCP-3 on mitochondrial function

# Sommaire

PREAMBULE.....	15
ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES.....	16
Chapitre I. Métabolismes glucidiques et lipidiques.....	17
I. Flux de substrat et voies métaboliques aérobies dans le muscle : place des lipides.....	17
A. Les voies métaboliques.....	17
1. La glycolyse.....	17
2. Dans la mitochondrie.....	18
B. Disponibilité en substrats.....	24
1. Dans le plasma.....	24
2. In situ.....	25
C. Transport des substrats lipidiques.....	25
1. Les transporteurs membranaires des AG sur le sarcolemme.....	25
2. Transport mitochondrial des AG.....	27
D. Oxydation du pyruvate et des acides gras.....	32
II. Notion de flux et de préférence métabolique de substrat.....	33
A. La flexibilité métabolique.....	33
1. Régulations physiologiques.....	33
2. Dérégulations pathologiques.....	34
B. Les facteurs de régulation hormonaux.....	35
1. Rapport insuline-glucagon.....	35
2. La leptine.....	36
3. L'apeline.....	36
4. Les insulino-modulateurs.....	36
C. Les régulations enzymatiques classiques : rôle compétiteur AG-glucose : le cycle de Randle....	37
1. Rôle central de la PDH dans la balance AG-glucose.....	39
2. Régulation de la concentration en malonyl-CoA.....	41
D. Régulation intrinsèque à la mitochondrie.....	42
Chapitre II. Les acteurs moléculaires de l'orientation métabolique.....	44
I. L'AMPK.....	44
A. Généralités.....	44
B. Les cibles de l'AMPK.....	44
1. La captation des substrats dans la cellule.....	44
2. L'oxydation des AG.....	46
3. L'AMPK : activateur de la biogenèse mitochondriale.....	46
II. Les PPARs.....	47
A. Généralités sur les PPARs et conséquences sur le métabolisme des AG.....	47
B. Phénotype métabolique et PPARs.....	50
1. Résistance à l'obésité.....	50
2. Bilan métabolique et dyslipidémie.....	50
3. Flexibilité métabolique.....	51
4. Mitochondrie et PPARs.....	52
C. Les cibles transcriptionnelles des PPARs impliquées dans le métabolisme des AG.....	52
1. Transport membranaire.....	53
2. Transport mitochondrial.....	53
3. Régulation de la PDH via PDK-4.....	55
4. $\beta$ -oxydation mitochondriale des AG par elle-même.....	56

D. Existe-t-il une spécificité des réponses à PPAR- $\alpha$ et PPAR- $\delta$ ?	56
III. La membrane mitochondriale : conductance protonique et protéines « découplantes »	58
A. <i>Les UCPs</i>	58
1. Potentiel de membrane : rôle découplant ou non d'UCP-3 ?	59
2. Rôle dans le choix de substrats	59
3. Rôle antioxydant	62
B. <i>L'hexokinase et la modulation du potentiel de membrane mitochondrial</i>	62
IV. UCP-3 et FoxO-1 : régulateurs et cibles de PPAR	63
A. <i>UCP-3</i>	63
B. <i>FoxO-1</i>	64
V. Inter-relations moléculaires et régulation du métabolisme énergétique	66
A. <i>Au cours du jeûne</i>	66
B. <i>Au cours d'un exercice aigu</i>	69
1. Intensité et durée d'exercice	69
2. Cibles à l'exercice	72

### Chapitre III. Modification de l'utilisation des substrats par les muscles squelettiques au cours de l'entraînement en endurance et de l'exposition à l'hypoxie

I. L'entraînement en endurance	77
A. <i>Glissement vers des puissances plus élevées du point de croisement glucido-lipidique</i>	77
B. <i>Adaptation quantitative et aspécifique</i>	79
1. Biogénèse mitochondriale	79
2. Enzymes du cycle de Krebs et PDH	79
3. Enzymes de la chaîne respiratoire	80
C. <i>Adaptations spécifiques de l'oxydation des AG</i>	80
1. Augmentation du transport des acides gras	81
2. Augmentation des enzymes de la $\beta$ -oxydation	83
3. Augmentation d'efficacité du système des créatine-kinases mitochondriales	83
D. <i>Induction des PPARs à l'entraînement</i>	84
II. L'hypoxie	85
A. <i>Généralités sur le métabolisme énergétique en hypoxie</i>	85
1. Une transition métabolique vers les glucides ?	85
2. Théorie plus actuelle d'un frein sur la PDH	86
B. <i>Hif-1, une voie classiquement induite à l'hypoxie</i>	87
C. <i>L'activation de l'AMPK, mythe ou réalité ?</i>	89
D. <i>PPARs et UCP, des voies inattendues en hypoxie</i>	90

## OBJECTIFS SCIENTIFIQUES

## MATERIELS ET METHODES

I. Conditionnement	97
A. <i>Les modèles d'hypoxie utilisés</i>	97
1. La chambre hypobare pour la stabulation	97
2. La tente à hypoxie hypoxique pour les entraînements	97
B. <i>Le gavage</i>	97
1. Le principe du gavage	97
2. Les avantages de la suspension	98
C. <i>L'entraînement</i>	98
1. Protocole	98
2. Calibration de l'entraînement entre normoxie et hypoxie	98
3. Evaluation de la performance en normoxie	98
II. Prélèvements	99

A. Les sacrifices .....	99
1. En hypoxie .....	99
2. Méthode de sacrifice .....	99
B. Les modes de préparation des tissus .....	100
1. Tissus frais .....	100
2. Tissus conservés.....	100
III. Respiration mitochondriale <i>in situ</i> .....	100
A. Principes .....	100
B. Préparation des fibres.....	100
C. Mesure de la consommation d'oxygène par oxygraphie.....	101
D. Les protocoles .....	102
IV. Biologie moléculaire .....	105
A. L'extraction d'ARN total .....	105
B. La reverse transcription .....	105
C. La PCR en temps réel.....	106
1. Principes.....	106
2. Les amorces.....	107
3. Quantification.....	107
V. Dosages enzymatiques.....	108
A. L'activité citrate synthase .....	108
1. Extraction des protéines .....	108
2. Dosage de l'activité de la citrate synthase (CS).....	108
B. L'activité 3-HAD .....	109
1. Extraction des protéines .....	109
2. Dosage de l'activité de la 3-HAD .....	109
RESULTATS .....	110
Etude 1 : modulation de l'affinité pour le palmitoyl carnitine en hypoxie .....	111
I. Justification du travail.....	111
II. Objectif .....	111
III. Plan expérimental .....	111
A. Résumé du plan expérimental.....	111
B. Rappel sur la spécificité tissulaire et la typologie musculaire .....	112
IV. Résultats et éléments de discussion.....	113
A. Morphologie et biochimie plasmatique.....	113
B. Absence d'altérations quantitatives mitochondriales .....	113
C. Une adaptation quantitative dissociée et spécifique de la nature du substrat .....	114
1. Effet propre de l'hypoxie .....	114
2. Effet de la restriction calorique .....	114
D. Une meilleure affinité pour le PC après exposition à l'hypoxie .....	115
E. Une réponse tissu-spécifique.....	116
F. Signification de nos résultats en physiologie intégrée.....	116
V. Article soumis.....	116
Etude 2 : cinétique des réponses transcriptionnelles au cours d'une exposition aiguë à l'hypoxie .....	142
I. Justification du travail.....	142
II. Objectifs.....	142
III. Plan expérimental .....	143
IV. Résultats .....	144

A. Données morphométriques : prise alimentaire et poids des animaux.....	144
B. Biochimie plasmatique.....	145
1. Les marqueurs de la lipolyse.....	145
2. Glycémie et insulinémie.....	146
C. Expression transcriptionnelle dans l'EDL et le soléaire.....	147
1. Voie de l'oxydation des AG : transcription des PPARs et de leurs gènes cibles.....	147
2. Stimulus hypoxique et gènes sensibles à l'oxygène.....	155
3. Musclicine et sensibilité à l'insuline ?.....	157
V. Elements de discussion.....	157
A. Réponses métaboliques précoces à l'hypoxie : temps 6h et 24h.....	157
1. Potentialisation des effets de la restriction calorique par l'hypoxie dans l'EDL.....	158
2. Limitation des effets de la restriction calorique par l'hypoxie dans le soléaire.....	158
3. Modulation des principaux facteurs de l'oxydation des AGLC.....	159
4. Effets liés à la restriction calorique.....	162
5. Effets propres de l'hypoxie.....	163
6. Proposition de la régulation transcriptionnelle lors d'une exposition in vivo à l'hypoxie.....	169
B. Réponses métaboliques retardées à l'hypoxie.....	170
1. Persistance de l'altération de LDH-A en pair-feeding dans l'EDL.....	171
2. Dissociation des effets de l'hypoxie et de la restriction calorique à sept jours dans le soléaire....	
Etude 3 : modulation du métabolisme des AG par un agoniste PPAR- $\delta$ .....	174
I. Justification du travail.....	174
II. Objectifs.....	175
III. Plan expérimental.....	175
IV. Résultats.....	177
A. Morphologie et biochimie plasmatique.....	177
1. Composition corporelle.....	177
2. Biochimie plasmatique de repos.....	177
B. Performance.....	180
1. Vitesse maximale aérobie (VMA).....	180
2. Temps limite.....	180
3. Biochimie à l'arrêt de l'exercice.....	181
C. Adaptations quantitatives mitochondriales.....	183
1. Capacités oxydatives globales.....	183
2. Capacités oxydatives pour le pyruvate.....	186
3. Capacités à oxyder les AGLC.....	186
4. Evolution relative entre capacités oxydatives maximales globales et spécifiques pour chaque substrat.....	186
D. Adaptations qualitatives mitochondriales.....	186
1. Chaîne respiratoire.....	186
2. Efficacité du système des créatine kinases mitochondriales.....	186
3. Facteur limitant de l'oxydation des AGLC.....	187
V. Eléments de discussion.....	199
A. Caractérisation d'un phénotype de repos sous GW 742.....	199
B. La performance.....	200
1. Capacité aérobie maximale.....	200
2. Temps limite.....	201
3. Evolution en miroir des taux de glucose et d'AGL en fin de temps limite chez les animaux traités.....	204
C. Adaptations métaboliques liée à l'entraînement en endurance.....	205
1. Adaptations des capacités oxydatives globales et d'utilisation du pyruvate.....	205
2. Adaptations des capacités oxydatives spécifiques des AG.....	206

3. Autres adaptations mitochondriales spécifiques de l'entraînement .....	210
D. Adaptations métaboliques liés à une exposition chronique à l'hypoxie .....	210
E. Effet propre du traitement par agoniste PPAR- $\delta$ .....	213
1. Agonistes PPAR- $\delta$ et fonction mitochondriale .....	213
2. Effets métaboliques extramitochondriaux du GW 742 sur le muscle squelettique.....	216
F. Coopérativité métabolique dans nos situations.....	217
1. Entraînement et agoniste PPAR .....	217
2. Entraînement et hypoxie .....	219
3. Hypoxie-agoniste PPAR- $\delta$ .....	222
4. Entraînement-hypoxie-agoniste PPARs.....	222
G. Que retenir de nos résultats sur le métabolisme énergétique dans ces diverses situations.....	224
H. Autres facteurs expliquant l'amélioration de la performance en endurance .....	225
1. Le poids corporel .....	225
2. Les facteurs cardio-pulmonaires et circulatoires.....	226
3. Les facteurs centraux.....	228
I. Compléments de données envisagées.....	228
<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>230</b>
<b>I. Critique de la technique de respiration mitochondriale dans l'étude de la préférence de substrat. .</b>	<b>231</b>
A. Avantages .....	231
B. Quel sens donner à nos mesures in situ ? .....	232
1. Niveau d'utilisation d'un substrat .....	232
2. Affinité pour un substrat .....	232
C. Limites et inconvénients .....	233
1. Régulation par le malonyl-CoA .....	233
2. Interrelation avec les glucides.....	233
3. Effet inhibiteur des AG sur la fonction mitochondriale.....	233
D. Améliorations envisagées dans le futur .....	234
<b>II. Confrontation des trois temps expérimentaux. ....</b>	<b>235</b>
A. Adaptation métabolique liée à l'hypoxie chronique.....	235
1. Effet dose de l'hypoxie .....	235
2. Densité mitochondriale et hypoxie.....	235
3. Utilisation des AG et hypoxie .....	239
4. Rôle propre de l'hypoxie.....	240
B. Conséquences métaboliques d'un agoniste PPAR- $\delta$ .....	240
1. Conséquences fonctionnelles sur l'utilisation de substrat par la mitochondrie .....	240
2. PPAR et phénotype musculaire.....	242
3. Rôle présumé des PPARs dans la situation d'hypoxie.....	243
C. Enseignements tirés de la situation d'entraînement .....	243
1. Pourquoi ne peut-on utiliser des AG à haute intensité d'exercice ? .....	243
2. Quelles étapes limitantes in situ à l'oxydation des AGLC après entraînement ? .....	244
<b>III. Apport de nos travaux à la connaissance de la spécificité tissulaire .....</b>	<b>245</b>
A. Capacités oxydatives maximales et spécificité tissulaire .....	246
B. Niveau maximal d'oxydation spécifique pour différents substrats et spécificité tissulaire.....	247
1. Absence de modulation de l'oxydation maximale en pyruvate .....	247
2. Capacités de $\beta$ -oxydation mitochondriale et du transport indépendant de CPT-1 .....	248
3. Capacité maximale de transport intra-mitochondrial des AG .....	248
C. Sensibilité aux AGLC .....	250
1. Affinité pour le PC et PCoA et type de muscle.....	250
2. Inhibition par le malonyl-CoA et type de muscle .....	251
D. Expression des PPARs et orientation de substrats .....	252
E. Composition membranaire et orientation de substrat.....	253
1. Fluidité membranaire .....	253

2. Expression d'UCP-3 .....	254
IV Apport de nos travaux à une réflexion thérapeutique.....	254
<i>A. Dissociation de la régulation entre flux en AG et capacités oxydatives</i> .....	255
1. Lipotoxicité et insulino-résistance : de l'obésité au diabète .....	255
2. Hypothèse réconciliatrice.....	256
<i>B Associer les bénéfices quantitatifs et qualitatifs ?</i> .....	258
1. Coopérativité PGC-1 $\alpha$ et PPAR .....	258
2. Situations de dysrégulation ou de corégulation.....	262
<i>C. Réflexions sur l'application à la prise en charge du syndrome métabolique</i> .....	263
1. Les dangers potentiels d'un agoniste pharmacologique de PPAR- $\delta$ .....	263
2. La pratique de l'exercice endurant.....	264
3. L'association d'agoniste PPAR- $\delta$ à l'exercice endurant.....	265
4. Quelle place pour l'hypoxie ? .....	266
5. Association des agonistes PPAR- $\delta$ à d'autres molécules.....	266
 CONCLUSION et PERSPECTIVES .....	 268
 BIBLIOGRAPHIE.....	 273
 ANNEXES.....	 290

## Liste des abréviations

<b>ACBP</b>	<i>Acyl-CoA Binding Protein</i>
<b>ACC</b>	Acétyl-CoenzymeA carboxylase
<b>ACS</b>	Acyl-CoA synthétase
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADP</b>	Adénosine diphosphate
<b>AG</b>	Acide gras
<b>AGCC</b>	Acide gras à chaîne courte
<b>AGL</b>	Acide gras libre
<b>AGCM</b>	Acide gras à chaîne moyenne
<b>AGLC</b>	Acide gras à longue chaîne
<b>AGPI</b>	Acide gras polyinsaturé
<b>AICAR</b>	5-amino-4-imidazolecarboxamide ribonucléoside
<b>AMPK</b>	<i>AMP-activated protein kinase</i>
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BNIP3</b>	<i>BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3</i>
<b>BSA</b>	Bovin serum albumin
<b>CAT</b>	Carnitine-acylcarnitine translocase
<b>COX</b>	Cytochrome C oxydase
<b>CPT-1</b>	Carnitine palmytoyl transférase-1
<b>CPT-2</b>	Carnitine palmytoyl transférase-2
<b>CREB</b>	<i>Cyclic-AMP response element binding</i>
<b>CS</b>	Citrate synthase
<b>CytC</b>	Cytochrome C
<b>Ddit-4</b>	<i>DNA damage inducible transcript-4</i>
<b>EDL</b>	<i>Extensor digitorum longus</i>
<b>EPO</b>	Erythropoïétine
<b>FABP-3</b>	<i>Fatty acid binding protein-3</i>
<b>FABPpm</b>	<i>Plasma membrane fatty acid binding protein</i>
<b>FADH</b>	Flavine adénine dinucléotide réduit, forme réduite
<b>Fat CD36</b>	<i>Fatty acid translocase CD36</i>
<b>FATP</b>	<i>Fatty acid transport protein</i>
<b>FoxO-1</b>	<i>Forkhead box O-1</i>
<b>G3-P</b>	Glycérol 3-phosphate
<b>G3PDH</b>	Glycérol 3-phosphate déshydrogénase
<b>Glut-4</b>	Transport du glucose-4
<b>GW 742</b>	Agoniste PPAR- $\delta$
<b>GW 501516</b>	Agoniste PPAR- $\beta/\delta$
<b>H</b>	Conditionnement en Hypoxie
<b>HAD (3-HAD)</b>	3-Hydroxy acyl coenzyme A déshydrogénase
<b>HDL</b>	<i>High density lipoprotein</i>
<b>HET</b>	Conditionnement en Hypoxie avec Entraînement
<b>Hif-1</b>	<i>Hypoxia-inducible factor</i>
<b>HTAP</b>	Hypertension artérielle pulmonaire
<b>HRE</b>	<i>Hypoxia-responsive element</i>
<b>IL-6</b>	Interleukine-6
<b>IRS</b>	<i>Insulin receptor substrate</i>
<b>IMF</b>	Intermyofibrillaire
<b>IMTG</b>	<i>Intramuscular triglyceride</i>
<b>KO</b>	<i>Knockout</i>
<b>Km</b>	Constante de Michaelis
<b>LCAD</b>	<i>Long chain acyl-CoA dehydrogenase</i>
<b>LDH</b>	Lactate déshydrogénase
<b>LDL</b>	<i>Low density lipoprotein</i>
<b>mAspAT</b>	Aspartate aminotransférase
<b>MCAD</b>	<i>Medium chain acyl-CoA dehydrogenase</i>

<b>MCoA</b>	Malonyl-CoenzymeA
<b>MCD</b>	Malonyl-CoenzymeA déshydrogénase
<b>MDH</b>	Malate déshydrogénase
<b>Mef-2</b>	<i>Myocyte enhancer factor-2</i>
<b>MHC</b>	<i>Myosin heavy chain</i>
<b>mi-CK</b>	<i>Mitochondrial creatine kinase</i>
<b>MTE</b>	Messenger de thioestérase mitochondriale
<b>N</b>	Conditionnement en Normoxie <i>ad libitum</i>
<b>NAD+</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée
<b>NADH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
<b>NRF-1</b>	<i>Nuclear respiratory factor</i>
<b>p38 MAPK</b>	<i>p38 Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>PC</b>	Palmitoyl carnitine
<b>PCoA</b>	Palmitoyl-CoenzymeA
<b>PDH</b>	Pyruvate déshydrogénase
<b>PDK</b>	Pyruvate déshydrogénase kinase
<b>PDP</b>	Pyruvate déshydrogénase phosphatase
<b>PF</b>	Conditionnement en Normoxie avec pair-feeding de l'hypoxie
<b>PFK</b>	Phosphofructokinase
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-<math>\gamma</math> coactivator-1<math>\alpha</math></i>
<b>PHD-1</b>	<i>Prolyl hydroxylase dehydrogenase (isoforme 1)</i>
<b>PI3K</b>	Phosphatidyl inositol 3 kinase
<b>PLA</b>	Muscle plantaire ( <i>plantaris</i> )
<b>PO2</b>	Pression partielle en oxygène
<b>PPAR</b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
<b>PPRE</b>	<i>Peroxisome proliferator response element</i>
<b>Q</b>	Ubiquinone
<b>RC</b>	Restriction calorique
<b>REDD-1</b>	<i>Regulated in development and DNA damage response-1</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i>
<b>RT-PCR</b>	<i>Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
<b>RXR</b>	<i>Retinoid X receptor</i>
<b>Sirt-1</b>	Sirtuine-1
<b>SDH</b>	Succinate déshydrogénase
<b>SOL</b>	Muscle soléaire ( <i>soleus</i> )
<b>SS</b>	Sous-sarcolemmal
<b>SSO</b>	Sulfo-N-succinimidyl oléate
<b>Sp-1</b>	<i>Stimulating protein-1</i>
<b>Tfam</b>	<i>Mitochondrial transcription factor</i>
<b>TG</b>	Triglycéride
<b>UCP</b>	<i>Uncoupling protein</i>
<b>VD</b>	Ventricule droit
<b>VDAC</b>	Voltage-dependent anion channel
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>VG</b>	Ventricule gauche
<b>VLCAD</b>	<i>Very long acyl-CoA dehydrogenase</i>
<b>V0</b>	Vitesse initiale
<b>Vmax</b>	Vitesse maximale
<b>VMA</b>	Vitesse maximale aérobie
<b>VO2max</b>	Consommation maximale aérobie
<b>VP-16</b>	Souris transgénique surexprimant PPAR- $\delta$ actif

# PREAMBULE

Dans le travail présenté ci-dessous, nous allons considérer le métabolisme énergétique mitochondrial et nous traiterons de l'utilisation des acides gras par le muscle squelettique sain.

Nous nous sommes attachés à mettre en lumière un certain nombre de mécanismes et d'éléments actuels, contribuant à l'orientation métabolique du muscle squelettique, au choix de substrat oxydé et à l'utilisation préférentielle des acides gras.

Après un bref rappel du métabolisme énergétique et de la contribution respective des métabolismes glucidique et lipidique au travail du muscle squelettique, nous aborderons la notion de « flexibilité métabolique », déclinons les possibles acteurs moléculaires impliqués, que nous illustrerons au travers les exemples concrets du jeûne et de l'exercice physique.

Nous décrivons ensuite deux situations, l'entraînement physique en endurance et l'exposition chronique à l'hypoxie, au cours desquelles des altérations de la préférence pour les substrats énergétiques se mettent en place. Ceci nous permettra alors de mieux comprendre la mise en œuvre de la « flexibilité métabolique » du muscle squelettique, dans le cadre d'une régulation purement physiologique ; toute approche en pathologie sera exclue de ce travail, même si nous discuterons en fin de document du transfert potentiel de nos résultats à la prescription de l'exercice physique dans le cadre des maladies métaboliques comme le diabète de type 2 ou l'obésité.

**ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES**

## Chapitre I. Métabolismes glucidiques et lipidiques

### I. Flux de substrat et voies métaboliques aérobies dans le muscle : place des lipides

La fourniture d'énergie dans la vie quotidienne et au cours d'un exercice physique prolongé n'intéresse que la filière aérobie ; la filière anaérobie n'étant le fait que des exercices très intenses et de courte durée. Pour fonctionner, cette filière aérobie nécessite l'apport en substrat et en oxygène au niveau du muscle (vascularisation et capillarisation). Le muscle va ainsi pouvoir oxyder les substrats dont il dispose au travers des différentes voies métaboliques présentées ci-après.

#### A. Les voies métaboliques

##### 1. La glycolyse

##### 1.1 La glycolyse

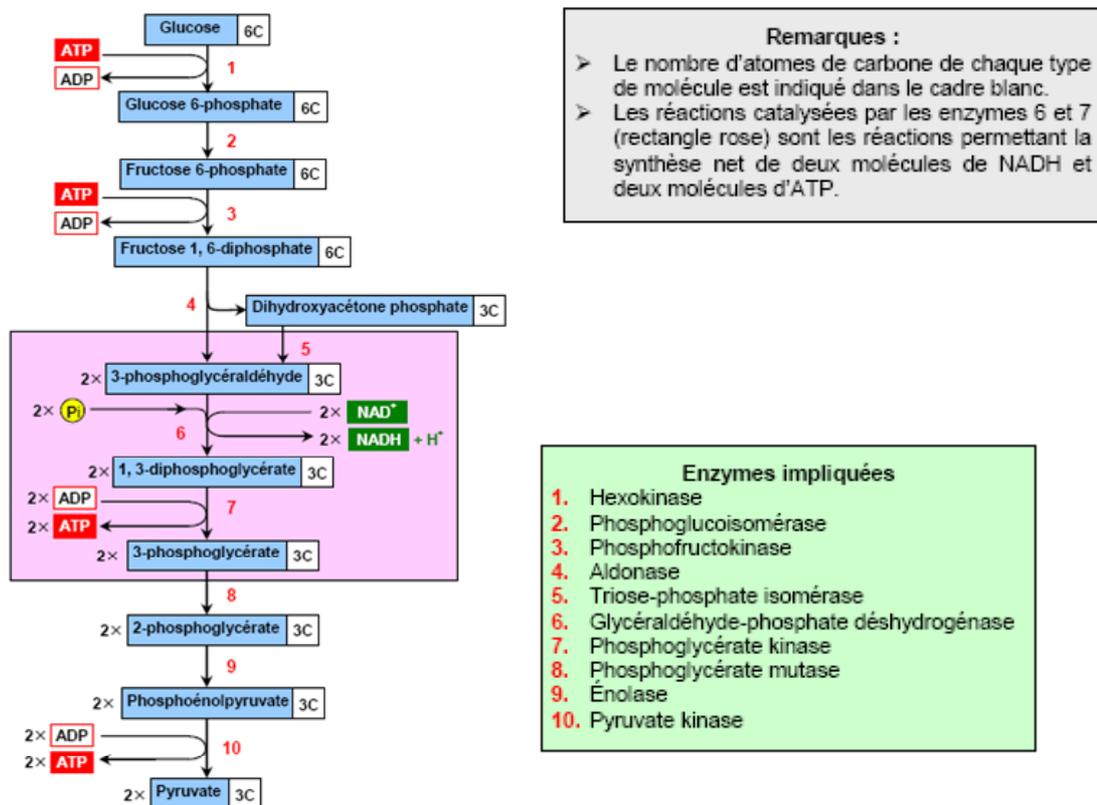


Figure 1 : étapes biochimiques de la glycolyse

La glycolyse correspond à l'étape d'oxydation du glucose aboutissant au pyruvate. Elle produit deux molécules d'ATP et deux molécules de NADH.

### 1.2 Du pyruvate à l'acétyl-CoA

Le pyruvate produit dans le cytosol lors de la glycolyse entre dans la mitochondrie par transport actif. Il y est transformé en acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) par décarboxylation oxydative grâce à trois enzymes composant le complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDH) dont nous reparlerons par la suite.

## 2. Dans la mitochondrie

Chaque mitochondrie se compose de quatre compartiments majeurs qui diffèrent par leurs compositions, leurs activités et leurs fonctions : une membrane externe, perméable aux molécules de poids moléculaire inférieur à 6 kDa, délimite la mitochondrie du cytoplasme. Une membrane interne délimite d'un part l'espace intermembranaire où sont localisées diverses protéines, d'autre part la matrice mitochondriale contenant diverses enzymes de différentes voies métaboliques telles que le cycle de Krebs ou l'oxydation des acides gras.

#### ► Membrane externe

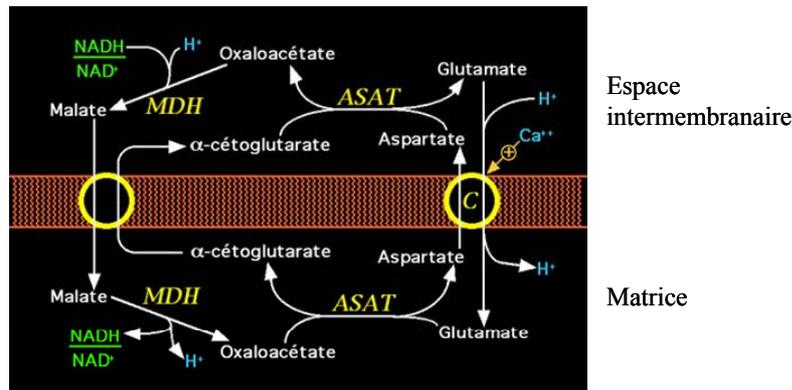
Elle contient de nombreuses copies d'une protéine de transport nommée porine, laquelle forme de grands canaux aqueux à travers la double couche lipidique. Cette membrane ressemble à un tamis perméable à toutes les molécules de 10 000 daltons, y compris de petites protéines et les acides gras à courte chaîne. La porine est également appelée canal ionique voltage dépendant (« VDAC » pour voltage-dependent anion channel) ; c'est la principale voie par laquelle transitent les métabolites régulant la respiration mitochondriale. Par ailleurs, plusieurs enzymes de diverses voies métaboliques peuvent être associées à la membrane externe *via* des interactions avec la porine. Ainsi, l'hexokinase, la glycérolkinase et l'acylCoA synthétase (ACS) peuvent réguler la fonction mitochondriale par l'intermédiaire de VDAC (Brdiczka, et coll., 1994)

#### ► Membrane interne

De perméabilité réduite et sélective, elle constitue une barrière maintenant un gradient de concentration d'ions et de métabolites entre le cytoplasme et la matrice mitochondriale.

En raison de sa faible perméabilité, la membrane interne dispose de nombreux systèmes de transport pour les échanges ioniques, et de métabolites. Le transport des substrats est réalisé par des systèmes plus ou moins complexes. Parmi ceux-ci, le système des navettes  $\alpha$ -glycérol phosphate spécifique des cellules musculaires et nerveuses, et la navette malate-aspartate ubiquitaire, permettant de transporter les équivalents réducteurs de NADH formés au cours de la glycolyse, du cytoplasme vers la mitochondrie.

► Les navettes



**Figure 2** : la navette malate/aspartate

Lorsque le rapport des concentrations NADH/NAD<sup>+</sup> dans le cytoplasme et l'espace intermembranaire vient à s'élever, la MDH (malate déshydrogénase) cytoplasmique réduit l'oxaloacétate en malate. Ce malate diffuse dans l'espace intermembranaire et est échangé par le transporteur de la membrane interne contre un  $\alpha$ -cétoglutarate. Une fois entrée dans la matrice, la MDH mitochondriale va oxyder le malate en oxaloacétate : de cette façon, l'hydrogène du NADH qui avait servi à réduire le malate à l'extérieur, se trouve transporté à l'intérieur de la mitochondrie.

Il faut noter que la navette malate-aspartate, le principal fournisseur de NADH à la mitochondrie, dépend de la force protomotrice. Un potentiel de membrane élevé favorise la captation du glutamate et l'extrusion de l'aspartate. Au contraire, si la force protomotrice s'effondre, par exemple en cas de découplage, alors l'entrée de NADH dans la mitochondrie s'en trouve limitée (Leverve, 2007)

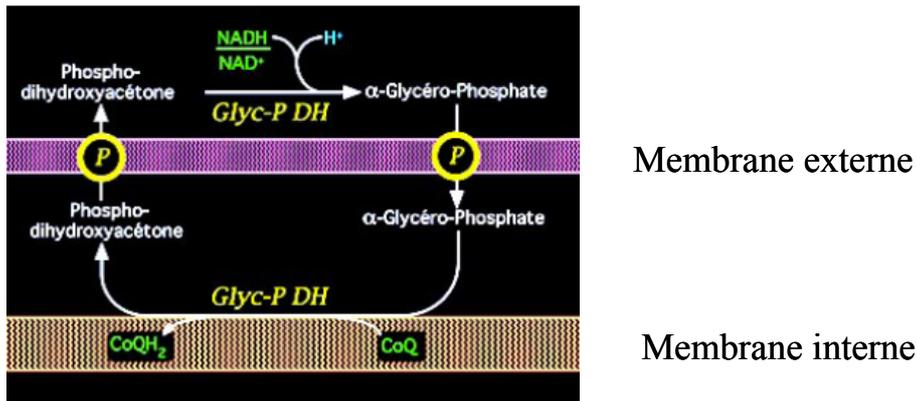


Figure 3 : la navette de l' $\alpha$ -glycérophosphate

La navette du glycérophosphate utilise encore la porine (P), un transporteur de la membrane externe qui échange les petites molécules de part et d'autre de cette membrane. Le glycérophosphate va entrer dans l'espace intermembranaire pour y être oxydé de nouveau par la glycérophosphate déshydrogénase mitochondriale, laquelle reforme la phosphodihydroxyacétone qui sera échangée contre le glycérophosphate qui vient d'entrer. Dans cet échange, les hydrogènes provenant du NADH servent à réduire un coenzyme Q dans la membrane interne de la mitochondrie. Si la différence de potentiel entre ces deux couples d'oxydoréduction, d'environ 380 mV, fournit largement l'énergie nécessaire à ce transport, elle nécessite la consommation d'un proton.

La navette de l' $\alpha$ -glycérophosphate est consommatrice d'un proton et nécessite donc une force protomotrice suffisante pour être opérant. Néanmoins, le rôle de la navette malate-aspartate dans ce transfert d'équivalents réduits est beaucoup plus important que celui de l' $\alpha$ -glycérophosphate.

2.1 La  $\beta$ -oxydation mitochondriale

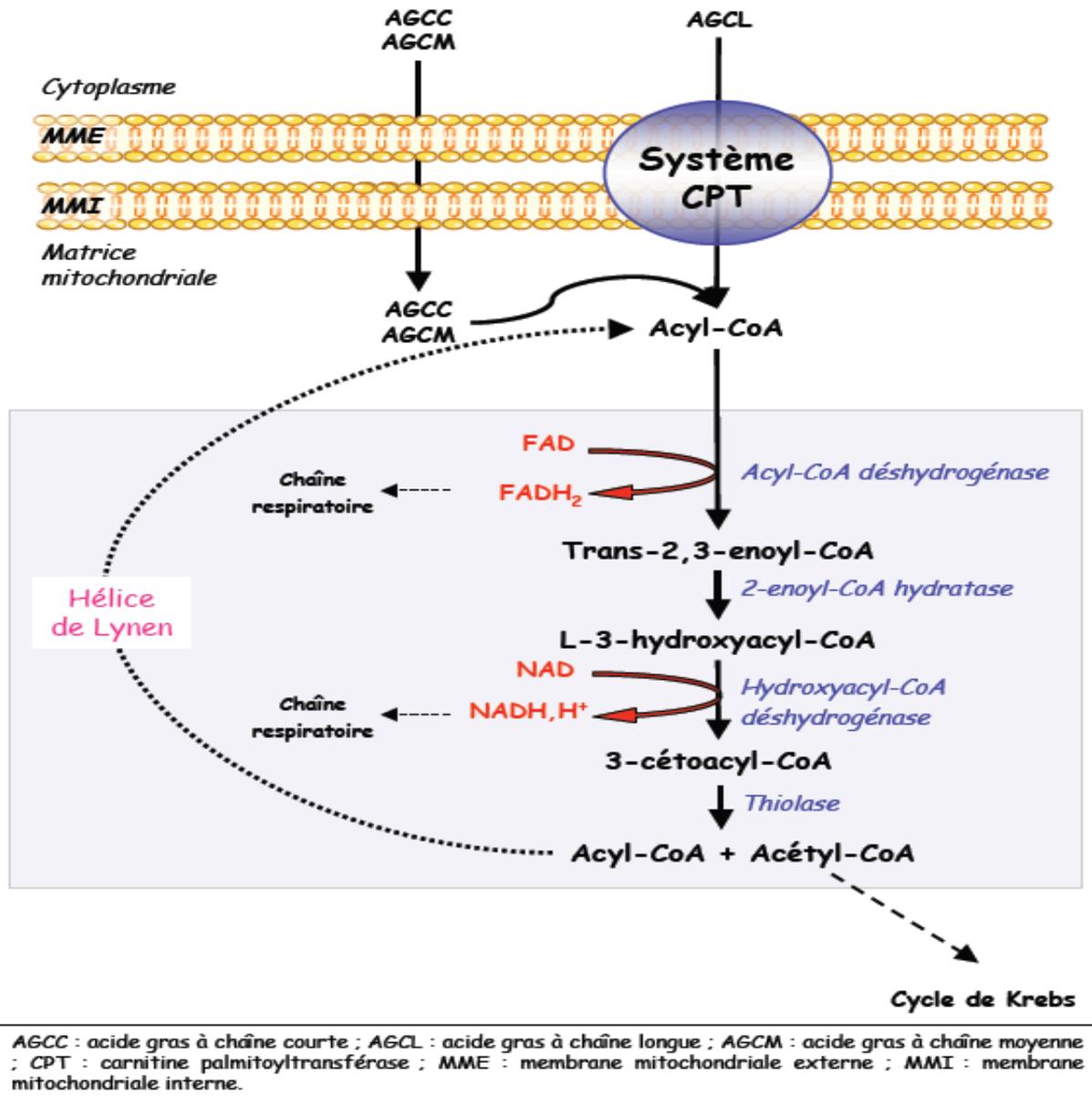


Figure 4 : les étapes biochimiques de la  $\beta$ -oxydation

Une fois que les acyl-CoA provenant des acides gras (AG) sont entrés dans la mitochondrie, une série de transformations va progressivement et de façon répétée leur enlever deux atomes de carbone à chaque tour d'hélice. Cette série de transformations est appelée  $\beta$ -oxydation, et à chaque étape elle va produire : un FADH<sub>2</sub>, un NADH et un acétyl-CoA par acyl-CoA.

Alors que, comme nous venons de le dire, le transport de NADH nécessite une force protomotrice élevée pour gagner la matrice mitochondriale, le FADH<sub>2</sub> peut directement alimenter le complexe II de la chaîne respiratoire, même en cas de gradient électrochimique effondré.

## 2.2 Le carrefour métabolique de l'acétyl-CoA : voie commune finale : le cycle de Krebs

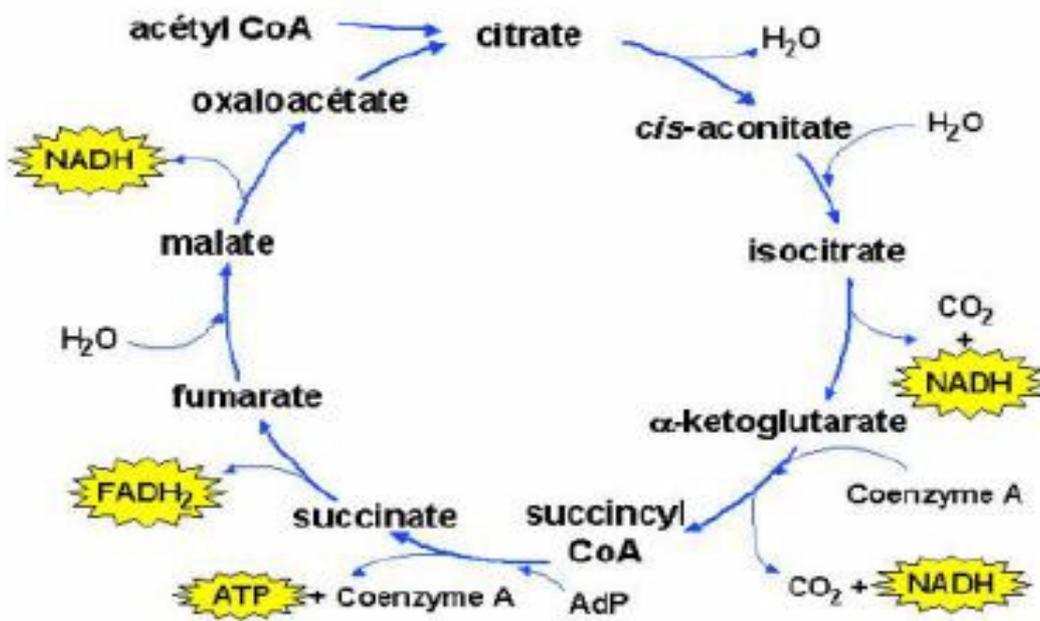


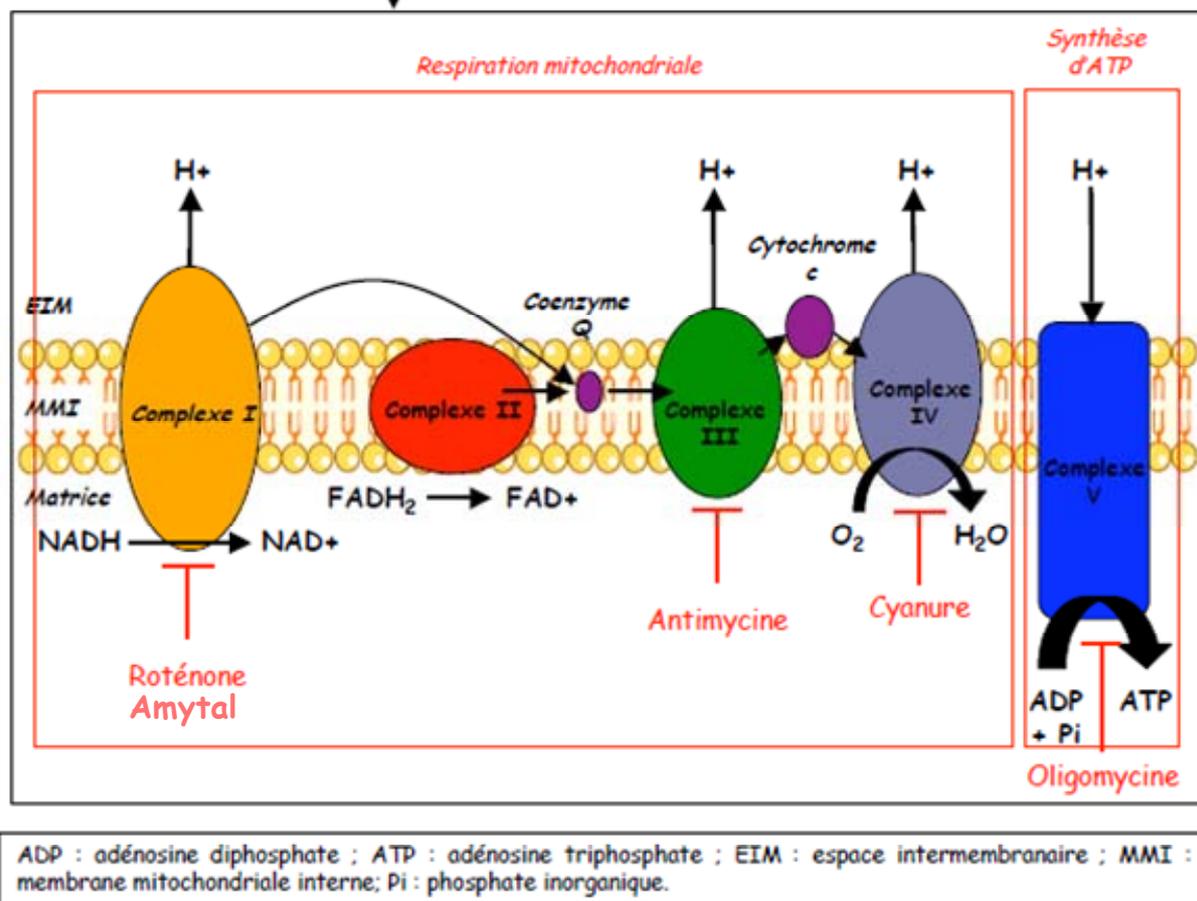
Figure 5 : le cycle de Krebs.

$NADH = \text{Nicotinamide adénine dinucleotide} + H^+$

$FADH_2 = \text{Flavine adénine dinucleotide} + 2H^+$

Le cycle de Krebs est une série de réactions biochimiques dont la finalité est de produire les équivalents réduits qui serviront à la production d'ATP dans la chaîne respiratoire. Il s'agit d'un cycle car le dernier métabolite, l'acide oxaloacétique, est aussi impliqué dans la première réaction. Il est la voie commune finale de toute molécule d'acétyl-CoA, qu'elle soit issue de la glycolyse ou de la β-oxydation.

## 2.3 La phosphorylation oxydative



**Figure 6** : schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale

Le terme de phosphorylation oxydative est employé pour décrire le couplage entre les oxydations d'équivalents réducteurs et la phosphorylation de l'ADP. Ce processus implique cinq complexes à multiples sous-unités, insérés dans la membrane interne et constituant la chaîne respiratoire. L'oxydation du NADH au niveau du complexe I (NADH-ubiquinone réductase), du succinate au niveau du complexe II (succinate-ubiquinone réductase) libère des électrons transportés le long de la chaîne de transport des électrons, par les complexes I, II, III et IV et deux composés mobiles l'ubiquinone (Q) et le cytochrome-c (Cyt c) qui se déplacent à l'intérieur de la bicouche lipidique de la membrane interne. Une orientation spécifique de ces différents éléments dirige le transport des électrons selon des séquences précises :

$I \rightarrow Q \rightarrow III \rightarrow \text{Cyt } c \rightarrow IV$  et  $II \rightarrow Q \rightarrow III \rightarrow \text{Cyt } c \rightarrow IV$ .

Le transfert d'électrons se réalise à travers une succession de réactions d'oxydoréductions avec différents constituants de ces complexes et est couplée à la translocation de  $H^+$  de la matrice vers l'espace intermembranaire uniquement au niveau des complexes I, III et IV (cytochrome c-oxydase). L'accepteur final des électrons est l'oxygène qui est réduit en deux molécules d'eau par le complexe IV.

Le gradient électrochimique de  $H^+$  génère une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane interne ( $\Delta\Psi = -220\text{mV}$ ) et constitue une source d'énergie électrochimique (appelée force protomotrice) pour la synthèse d'ATP effectuée par l'ATP synthase ou complexe V.

Il faut noter que la force protomotrice générée par le complexe I (et qui correspond donc à l'oxydation d'équivalents réduits de type NADH) est supérieure à celle générée par le complexe II correspondant à l'oxydation de FADH<sub>2</sub>. Aussi, pour maintenir un potentiel de membrane suffisant ; il faut que le flux de NADH persiste sans défaut de fourniture.

## ***B. Disponibilité en substrats***

### **1. Dans le plasma**

Alors que la glycémie est une variable finement régulée, la quantité d'acides gras libres (AGL) dans le plasma peut varier de façon très importante en physiologie (multiplié par 10 au cours de l'exercice). La principale source d'AGL de l'organisme est stockée sous forme de triglycérides (TG) dans le tissu adipeux blanc. Pour être mobilisés, les triglycérides sont hydrolysés pour être transformés en acides gras ( $TG \Rightarrow 3AG + \text{glycérol}$ ). Les acides gras ainsi libérés passent dans le sang où ils se lient à l'albumine pour pouvoir être transportés vers les tissus où ils seront oxydés.

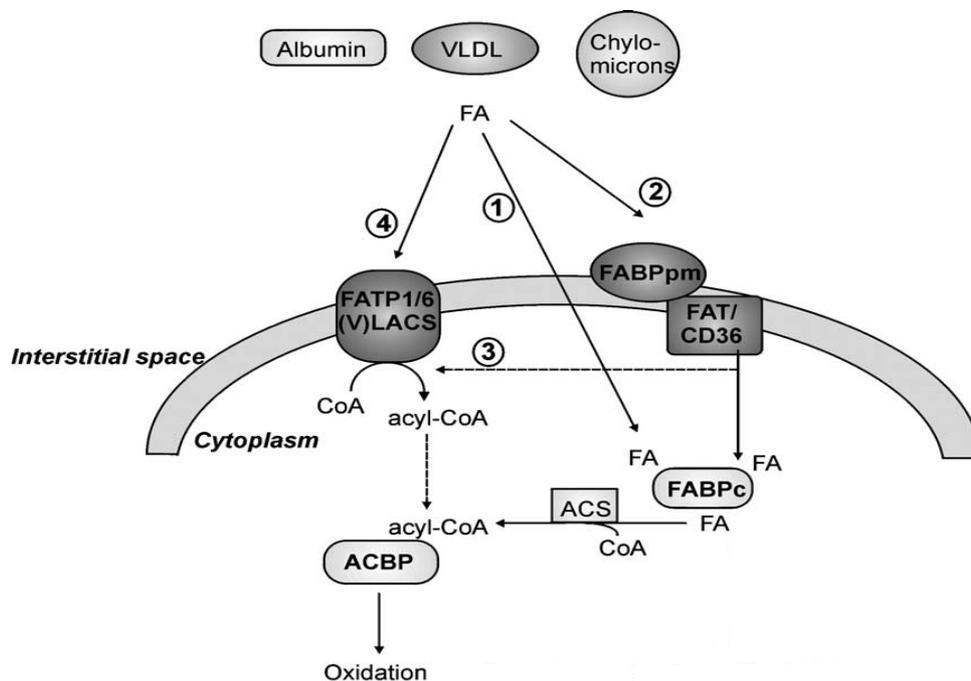
Le glucose est, lui, stocké dans le foie sous forme de glycogène. Au cours de la glycogénolyse, ce stock peut être mobilisé et alimenter le plasma en molécules de glucose. Alors que les réserves en glycogène sont assez vite épuisées (24 h de jeûne ou 2 heures d'exercice à 80% de la puissance maximale aérobie), les réserves en AG sont quasiment inépuisables même chez un sujet maigre. Néanmoins, le foie et le rein possèdent la capacité de produire du glucose à partir de substrats non glucidiques (lactate, glycérol ou certains acides aminés glucoformateurs) : c'est la néoglucogenèse, mais celle-ci reste limitée et coûteuse en énergie en comparaison du processus de lipolyse.

## 2. In situ

Outre la disponibilité plasmatique, le muscle possède aussi ses propres stocks en glycogène et TG qui sont notamment modulables par un entraînement endurant.

### C. Transport des substrats lipidiques

#### 1. Les transporteurs membranaires des AG sur le sarcolemme



**Figure 7 :** transport membranaire des AG. (Koonen, et coll., 2005)

Le passage du plasma au milieu intramusculaire peut se faire par diffusion simple, à travers la membrane, pour les acides gras à chaîne courte (4 à 6 carbones) ou moyenne (8 à 10 carbones). Pour les acides gras à chaîne longue (plus de 12 carbones), la diffusion simple ne suffit pas, il faut un transporteur (Luiken, et coll., 1999). Plusieurs protéines seraient impliquées : les « fatty acid » transporteurs (FATPs), la fatty acid translocase CD36 et les « fatty acid binding » protéines (FABP).

### 1.1 Les FATPs

Les fatty acids transport protein (FATPs) sont présentes sous les isoformes 1 et 4 dans le muscle squelettique et les isoformes 1 et 6 dans le myocarde. FATP1 est liée à une acyl-CoA synthétase à longue chaîne, sensible à l'insuline. Elle pourrait ainsi participer à l'augmentation de la captation des AG en réponse à une sécrétion insulinique et faire pendant au transport insulino-dépendant du glucose médié par le transporteur, Glut-4. Aussi, elle tiendrait un rôle particulier dans la captation des AG en période postprandiale et pourrait participer à l'insulinorésistance périphérique. Dans les modèles de souris déficientes en FATP-1, on observe un défaut d'accumulation des AG dans le muscle en postprandial aux dépens du foie. S'il ne se développe donc pas d'insulinorésistance musculaire dans ce modèle après un régime riche en graisse, la lipotoxicité au niveau hépatique est accrue et conduit au développement précoce d'une stéatose (Doege and Stahl, 2006).

### 1.2 Fat CD36

Il existe un pool cytosolique pour cette protéine Fat CD36, qui peut être transloqué à la membrane sarcolemmale sous certaines conditions comme notamment la contraction musculaire (Bonen, et coll., 2004, Bonen, et coll., 2002). Il existe également une régulation transcriptionnelle en réponse à une élévation des AGL (Bastie, et coll., 2005, Nahle, et coll., 2008).

### 1.3 FABPpm

La protéine dénommée « plasma membrane-associated fatty acid binding protein » (FABPpm) serait liée à Fat CD36, les deux protéines agissant de concert pour faciliter la dissociation des AGL de l'albumine qui les transporte dans le plasma (Luiken, et coll., 1999). Une fois dans la cellule, les acides gras sont activés sous forme d'acyl-coenzyme A (acyl-CoA) par l'ACS. L'acyl-CoA ainsi formé se lie avec une protéine de transport : l'acyl-CoA Binding Protein (ACBP) qui l'amène au niveau de la membrane externe de la mitochondrie.

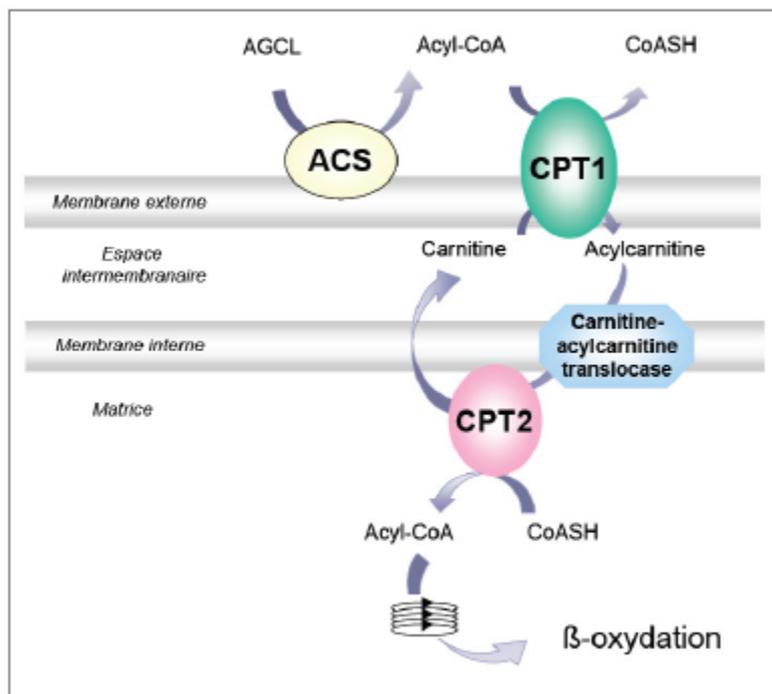
## 2. Transport mitochondrial des AG

### 2.1 AGCC et AGCM : simple diffusion

Là encore, les acides gras à chaînes courtes et moyennes vont pouvoir pénétrer par simple diffusion, ce qui est impossible pour les acides gras à longues chaînes.

### 2.2 Le système des carnitine palmitoyltransférases et de la carnitine acyltranslocase

Les acides gras à longue ou moyenne chaîne sont, eux, transportés vers la mitochondrie sous forme d'acyl-CoA et d'acyl-carnitine *via* le système des carnitine palmitoyltransférases I et II et de la carnitine acylcarnitine translocase, découvertes dans le milieu des années 1970 (McGarry and Brown, 1997, McGarry, et coll., 1977). Actuellement, ce système est schématisé ainsi comme montré dans la figure 8 (Kerner and Hoppel, 2000).



**Figure 8** : transport transmembranaire mitochondrial des acides gras à chaînes longues.

*ACS*= Acyl-CoA synthétase ; *CPT*= Carnitine palmitoyl transférase 1 & 2 ; *AGLC*=Acide gras à chaîne longue

## a) CPT-1

D'après la littérature, c'est ce système de transporteur qui serait le régulateur de l'oxydation des lipides et le facteur limitant du transport des AGLC. Cette protéine de transport, CPT-1 est associée à la membrane externe et existe sous deux isoformes principales (trois avec l'isoforme cérébrale) : la forme CPT-1a, présente dans le foie et la forme CPT-1b, présente dans le muscle squelettique et le cœur. Ces deux isoformes présentent des caractéristiques différentes, notamment concernant leur sensibilité au malonyl-CoA, régulateur physiologique qui inhibe l'activité CPT-1.

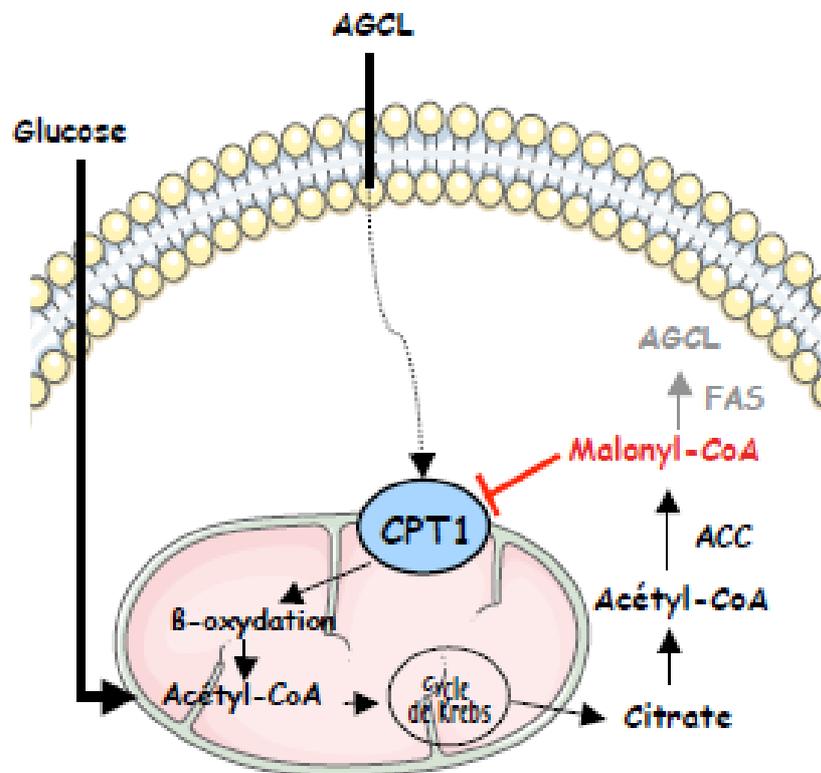


Figure 9 : régulation de CPT-1 par le malonyl-CoA

► Sensibilité au malonyl-CoA

Ainsi, la concentration en malonyl-CoA pour inhiber l'isoforme hépatique est plus importante que celle nécessaire dans le muscle ( $[IC_{50}] \approx 2,7\mu\text{M}$  pour le foie vs  $[IC_{50}] \approx 0,03\mu\text{M}$  pour le muscle). Donc CPT-1a serait spontanément plus résistant à l'inhibition par le malonyl-CoA alors que CPT-1b y serait naturellement 100 fois plus sensible. Si l'interaction entre les extrémités  $\text{NH}_2$  et  $\text{COOH}$  de la protéine CPT-1a a récemment été identifiée comme

modulateur potentiel de la sensibilité de CPT-1 au malonyl-CoA (Faye, et coll., 2005). La forme musculaire serait plus stable et moins sensible aux modifications conformationnelles et à l'environnement membranaire que la forme hépatique, garantissant une sensibilité importante à l'inhibition par le malonyl-CoA.

Les concentrations en malonyl-CoA varient aussi d'un tissu à l'autre : elles sont dix fois supérieures dans le foie (1-5  $\mu\text{M}$ ) comparées au muscle. Aussi, compte tenu de ce rapport, le transport CPT-1 dans le muscle devrait toujours être inhibé. Ce qui n'est évidemment pas le cas, laissant présager d'autres mécanismes régulateurs de la sensibilité, même si le malonyl-CoA apparaît encore aujourd'hui comme le principal inhibiteur physiologique de CPT-1 (Alam and Saggerson, 1998).

► Fraction indépendante du malonyl-CoA

Même si la forme musculaire de CPT-1 est sensible au malonyl-CoA, et malgré des concentrations très importantes, la totalité de l'activité CPT1 ne peut pas être inhibée par le malonyl-CoA dans le muscle. En 2002, Kim s'est intéressé à cette fraction de CPT-1 résistante au malonyl-CoA et présente en quantités différentes suivant la typologie musculaire. Ainsi seulement 40% de l'activité CPT-1 est susceptible d'être inhibé dans un muscle oxydatif comme le soléaire alors dans la partie superficielle du gastrocnémien entièrement glycolytique, c'est presque l'intégralité de l'activité qui est inhibée en présence de malonyl-CoA avec un degré intermédiaire de 60% d'inhibition dans l'EDL. Bien que l'on identifie de mieux en mieux les propriétés physicochimiques responsables de la sensibilité au malonyl-CoA (Faye, et coll., 2005), les bases moléculaires supportant une telle tissu-spécificité ne sont pour l'instant pas connues malgré plusieurs hypothèses, dont celle d'un épissage alternatif.

► Rôle du stock en carnitine

Comme l'activité optimale de CPT-1 est sous-tendue à des concentrations de carnitine au moins équivalente à cinq fois le  $K_m$  et comme l'affinité de la forme musculaire de CPT-1 pour la carnitine est environ dix fois moindre que celle de la forme hépatique, on comprend l'importance de la disponibilité en carnitine pour la fonctionnalité CPT-1 dans le muscle. Ainsi, depuis quelques années, outre la concentration en malonyl-CoA, certains auteurs considèrent que le stock en carnitine libre dans le cytosol pourrait, dans certaines circonstances, être l'élément limitant du transport des AGLC : évidemment dans le cadre de certains déficits pathologiques en carnitine mais aussi vraisemblablement à l'exercice de

haute intensité (Stephens, et coll., 2007). Pour ces auteurs, à haute intensité d'exercice, le flux de pyruvate et la fourniture en acétyl-CoA dérivée pourraient dépasser les capacités oxydatives du cycle de Krebs, entraînant une conjugaison de l'excès d'acétyl-CoA à la carnitine libre. Il se produirait alors une compétition entre acyl-carnitine et acétyl-carnitine pouvant dépléter les stocks en carnitine, ce qui pourrait retentir sur les capacités de transport du système carnitine palmitoyl transférase. Néanmoins, il n'existe pour l'instant aucune application ergogénique avérée à l'usage d'une supplémentation en L-carnitine, et ces données restent pour l'instant des hypothèses très fondamentales.

#### b) CAT et CPT-2

Les acyl-carnitine, générés par CPT-1, sont transloqués dans l'espace intermembranaire grâce à la carnitine acylcarnitine translocase intégrée dans la membrane interne, et CPT-2 régénère ensuite la carnitine, à nouveau disponible dans l'espace intermembranaire et les acylCoA transférés dans la matrice mitochondriale pour y subir la  $\beta$ -oxydation.

Alors qu'il n'existe pas de déficit de la forme musculaire de CPT-1b identifiée à ce jour, un déficit génétique en CPT-2 a été découvert pour la première fois en 1973. Selon la mutation identifiée, le tableau varie d'une forme « adulte » bénigne marquée par des épisodes de rhabdomyolyse au cours d'exercices prolongés à une forme « infantile sévère », responsable de malaises avec hypoglycémie et hypocétonémie profondes aboutissant souvent à des morts subites avant l'âge d'un an (Bonfont, et coll., 2004).

#### c) Les points de contact membrane interne-membrane externe

Les deux membranes mitochondriales ne sont pas complètement dissociées l'une de l'autre mais sont, en plusieurs endroits, en étroite association sans être fusionnées. Des études en microscopie électronique et l'isolement par centrifugation en gradient de saccharose de fractions membranaires de densité intermédiaire entre celles des membranes externe et interne démontrent l'existence de sites de contact entre les deux membranes mitochondriales (Brdiczka, 1991). Ils peuvent être les sites préférentiels où ont lieu l'importation des protéines mitochondriales et le transfert des acides gras *via* CPT-1 et CPT-2, étant donné l'importante concentration de ces protéines en ces lieux (Fraser and Zammit, 1998). Cependant cette modulation du transport des AGLC par le jeu des contacts membranaires n'a pour l'instant été mis en évidence que dans le foie. D'autre part, ces sites de contact sont le lieu de formation du

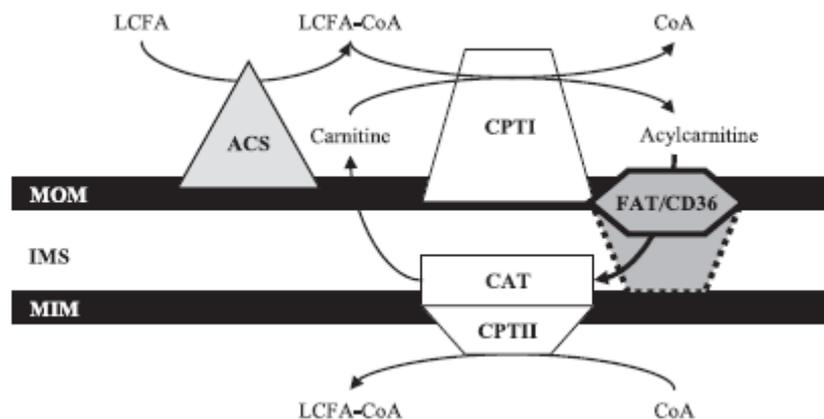
pore de transition de perméabilité, impliqué dans l'apoptose cellulaire et les mouvements du calcium.

Pour divers tissus, il est montré que les kinases (hexokinases, créatine kinase mitochondriale...) sont aussi concentrées en ces sites et peuvent former des complexes avec la porine et l'ADP/ATP translocase (Brdiczka, et coll., 1994).

## 2.3 Autres

### a) Fat CD36

La présence de Fat CD36 à la membrane mitochondriale est de découverte récente (Bonen, et coll., 2004) et semble issue d'une translocation du pool cytosolique de Fat CD36. Ce système serait monté en série avec CPT-1 ; cependant il ne pourrait en aucun cas suppléer le transport CPT-1 (Bezaire, et coll., 2006), tout au plus faciliter le dernier. En effet, comme le prouve la co-immunoprécipitation de ces deux protéines, elles partagent d'étroites relations. En pratique, l'importance de Fat CD36 en physiologie est encore difficile à affirmer. Il ne joue vraisemblablement qu'un rôle modeste dans l'oxydation basale des AGLC (King, et coll., 2007), mais pourrait s'avérer important dans certaines situations nécessitant une oxydation accrue des AG, notamment à l'exercice (Holloway, et coll., 2009), ou lors de la contraction musculaire.



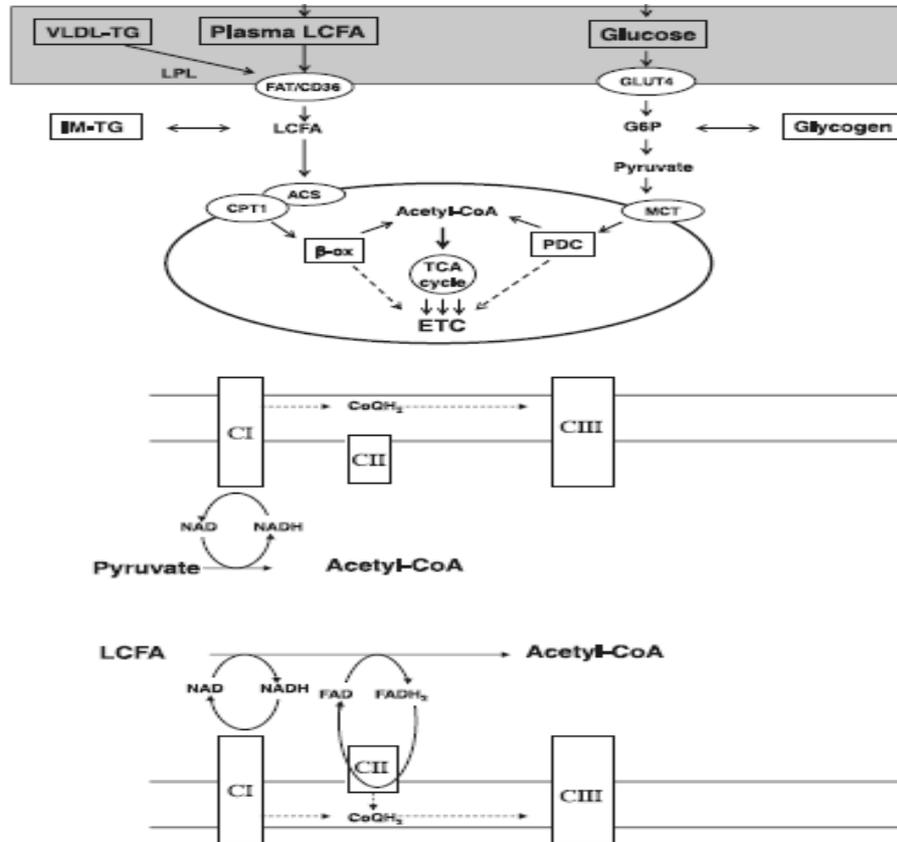
**Figure 10** : schéma du fonctionnement couplé de Fat CD36 avec CPT-1 dans le transport mitochondrial des AGLC, d'après Bezaire (Bezaire, et coll., 2006).

b) FABPpm

De la même façon que pour le pool cytosolique de Fat CD36, FABPpm est présente sur la membrane mitochondriale où elle est mieux connue sous le nom d'aspartate aminotransférase (mAspAT), codée par le gène GOT2. Cette protéine est impliquée dans la réaction réversible que nous avons détaillée dans la présentation de la navette malate-aspartate: Glutamate + oxaloacétate ↔ aspartate + 2-oxoglutarate.

Alors que Fat CD36 participe au transport mitochondrial des AGLC dans la mitochondrie sous certaines conditions, ce rôle semble peu probable pour FABPpm. En effet, une étude par transfection génique surexprimant FABPpm dans le soléaire de rat ne permet pas de retrouver d'augmentation de l'oxydation du palmitate, alors même que le contenu cytosolique - mais aussi mitochondrial - en FABPpm/mAspAT est augmenté. Aussi, FABPpm serait essentiellement impliquée dans le transport sarcolemmal des AGLC et jouerait un rôle au niveau mitochondrial exclusivement dans le transfert d'équivalents réduits du cytoplasme vers l'intérieur de la mitochondrie (Holloway, et coll., 2007).

**D. Oxydation du pyruvate et des acides gras**



**Figure 11** : voies de l'oxydation du pyruvate et des AG, d'après Sahlin (Sahlin, et coll., 2007)

Au total, l'oxydation d'une molécule de glucose aura produit 10 NADH/2 FADH<sub>2</sub> (2 NADH issus de la glycolyse, 2 NADH issus de la transformation du pyruvate en acétylCoA et 6 NADH/2 FADH<sub>2</sub> formés par les 2 molécules d'acétylCoA dans le cycle de Krebs) alors que l'oxydation d'une molécule d'hexanoate (acide gras à 6 carbones) aura produit 11 NADH/8 FADH<sub>2</sub> (2 NADH et 2 FADH produits dans l'hélice de Lymn et 9 NADH/6 FADH<sub>2</sub> issus des 3 molécules d'acétylCoA). La quantité d'énergie générée par ces deux substrats est également différente puisqu'un gramme de glucose fournira 3,87 calories alors qu'un gramme de lipide fournira 9,68 calories, soit plus du double.

Après avoir détaillé de façon pédagogique, mais cependant peu fonctionnelle, chacune de ces deux voies métaboliques, nous allons voir comment elles sont en mesure d'interagir l'une avec l'autre, ces métabolismes coexistant en permanence dans un organisme vivant.

## **II. Notion de flux et de préférence métabolique de substrat**

### ***A. La flexibilité métabolique***

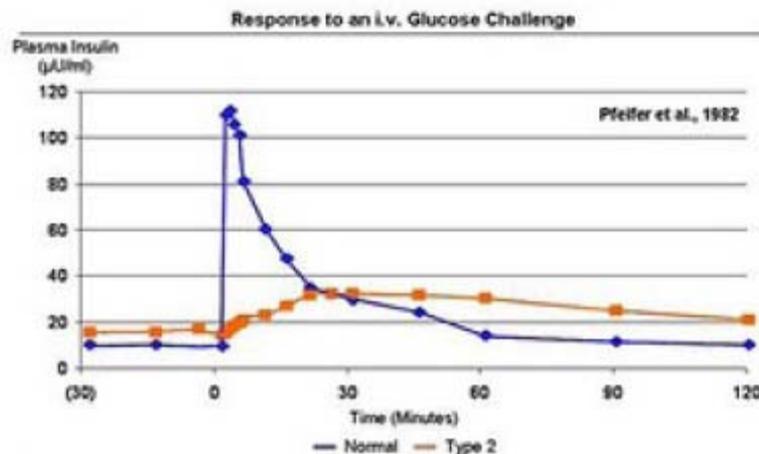
La flexibilité métabolique a initialement été décrite comme la capacité de l'organisme à moduler le substrat qu'il oxyde en fonction de la disponibilité de ce dernier.

#### **1. Régulations physiologiques**

Aussi, il a très tôt été observé une modulation du quotient respiratoire au cours de la journée, en relation avec les périodes de prise alimentaire. Alors qu'en période postprandiale, la disponibilité en glucose est élevée, le quotient respiratoire tend vers 1 c'est-à-dire à une oxydation quasi-exclusive du glucose. Au contraire, à distance d'un repas comme à l'issue du jeûne nocturne physiologique, la disponibilité en glucose diminue, l'insulinémie baisse, le cortisol s'élève permettant une lipolyse qui augmente la disponibilité en AGL. Celle-ci s'accompagne d'une diminution du quotient respiratoire traduisant une oxydation préférentielle des lipides (Thyfault, et coll., 2006).

## 2. Dé-régulations pathologiques

Cette modulation nyctémérale prandiale du quotient respiratoire existe chez le sujet sain mais semble altérée chez les patients obèses, souffrant d'une intolérance au glucose voire parmi les diabétiques de type 2. Le premier à avoir utilisé le terme « d'inflexibilité métabolique » est Kelley qui, dans une série de travaux, relie ces interactions complexes glucides-lipides au tableau d'insulinorésistance (Kelley and Goodpaster, 2001, Kelley, et coll., 2002, Kelley and Mandarino, 2000). Il traduit ainsi l'incapacité de ces différents tableaux métaboliques à moduler le quotient respiratoire. Ainsi chez les obèses, le quotient respiratoire varie très peu comparativement à celui des sujets sains : il ne s'abaisse pas à distance d'un repas, mais ne s'élève pas non plus en période postprandiale, ce qui traduit un défaut de la réponse insulinique précoce (le premier pic), ne permettant pas de normaliser la glycémie. Celle-ci reste élevée et entretient une sécrétion d'insuline en plateau persistant à distance du repas.



**Figure 12** : évolution de la sécrétion d'insuline après une charge glucosée chez le sujet sain et diabétique de type 2, d'après Pfeifer (Pfeifer, et coll., 1982)

*Ainsi la flexibilité métabolique relie l'utilisation de substrats à la disponibilité en substrats, en permettant une adaptation permanente de la balance des oxydations entre acide gras et glucides à la disponibilité glucido-lipidique. Le champ d'application de ce principe concerne les variations prandiales de la disponibilité en substrats, c'est-à-dire des situations dans lesquelles il existe un état énergétique globalement stable. Toute extrapolation de ce principe à une situation de grande crise énergétique serait évidemment aberrante. Aussi ce qui est totalement licite et vérifié ici pour un métabolisme basal en situation de repos, ne signifie pas pour autant que la disponibilité en AGL soit le facteur limitant à l'utilisation maximale de ce substrat en situation d'exercice. Par contre ce défaut d'adaptation en situation de repos peut, sans nul doute, contribuer au développement d'une lipotoxicité aggravant l'état d'insulinorésistance.*

### ***B. Les facteurs de régulation hormonaux***

Ces facteurs ne sont ici qu'évoqués pour replacer notre discours dans un organisme intégré, qui n'est ni une mitochondrie isolée, ni même une fibre musculaire *ex vivo*.

#### **1. Rapport insuline-glucagon**

Cette modulation rappelle inévitablement les variations prandiales de l'insuline et du glucagon. L'insuline, sécrétée en réponse à l'élévation de la glycémie, va permettre d'une part l'utilisation du glucose exogène par le muscle squelettique, et d'autre part son stockage dans le foie sous forme de glycogène et dans le tissu adipeux sous forme de triglycérides. En période post-prandiale, le muscle est responsable de la captation de 90% du glucose en réponse au pic insulinaire. Outre son rôle propre dans la translocation au sarcolemme d'un transporteur du glucose insulinorequérant, de type Glut-4 et du transporteur des AG, Fat CD36 (Luiken, et coll., 2002), l'insuline participe directement à l'orientation métabolique au niveau du carrefour de l'acétyl-CoA en favorisant la voie de synthèse des AG.

## 2. La leptine

Hormone synthétisée par le tissu adipeux blanc qui possède deux grandes fonctions : à court terme, elle participe à la régulation de la prise alimentaire en déclenchant la satiété, alors qu'à moyen terme, elle est impliquée dans le maintien de l'homéostasie pondérale. Elle est aussi, contrairement à l'insuline qui est l'hormone de stockage, capable de stimuler l'oxydation des AG (Ceddia, 2005).

## 3. L'apeline

C'est une adipokine plus qu'une hormone insulinosensibilisatrice ; elle fait figure « d'insuline like » factor.

## 4. Les insulinomodulateurs

### 4.1 Le GLP-1

Le « glucagon-like peptide-1 » est une hormone sécrétée par l'intestin en réponse au passage d'une charge glucosée orale, de demi-vie extrêmement brève (moins de 5 minutes). Elle est notamment capable d'augmenter la sécrétion pancréatique d'insuline en réponse au glucose, de limiter la production de glucagon et de renforcer les effets de l'insuline sur les cellules pancréatiques.

### 4.2 L'adiponectine

C'est une adipokine, dont on sait maintenant qu'elle n'est pas exclusivement sécrétée par le tissu adipeux blanc, qui présente un effet insulinosensibilisateur. Si sa diminution est assez constamment retrouvée chez l'obèse et dans tous les tableaux d'inflammation de bas grade commun au syndrome métabolique, on pense que sa perturbation pourrait être très précoce dans le développement de l'insulinorésistance.

### 4.3 IL-6, résistine

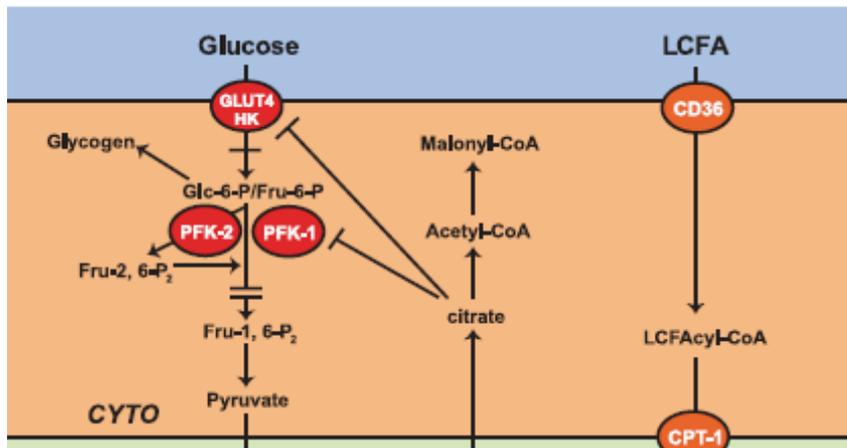
Enfin, de nombreuses cytokines, en particulier sécrétées par le tissu adipeux blanc, viennent freiner l'action périphérique de l'insuline ; c'est le cas notamment de l'interleukine-6 (IL-6) et de la résistine.

**C. Les régulations enzymatiques classiques : rôle compétiteur AG-glucose, le cycle de Randle**

Outre ces régulations hormonales, Randle et Newsholmes ont enrichi ces modulations hormonales d'une explication biochimique, décrivant en 1963 le « cycle glucose-acides gras», connu sous le nom de cycle de Randle (Randle, et coll., 1963).

*La définition historique décrit comment l'oxydation des AGL peut limiter celle du glucose au niveau cellulaire par le jeu de métabolites intermédiaires, qui inhibent certaines enzymes de la glycolyse.*

L'oxydation des AG conduirait à une accumulation d'acétyl-CoA entraînant une accumulation de citrate. Cette élévation de citrate cytosolique inhiberait la 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1) limitant le flux glycolytique et provoquant une accumulation en amont de glucose-6-phosphate, produit de l'hexokinase et principal inhibiteur de cette enzyme. Néanmoins dans le muscle, le rôle de l'hexokinase dans la captation du glucose semble nettement moindre que dans d'autres tissus, notamment dans le foie. En effet, l'essentiel de la captation du glucose est contrôlé dans le muscle par la translocation du transporteur Glut-4 à la membrane sarcolemmale.

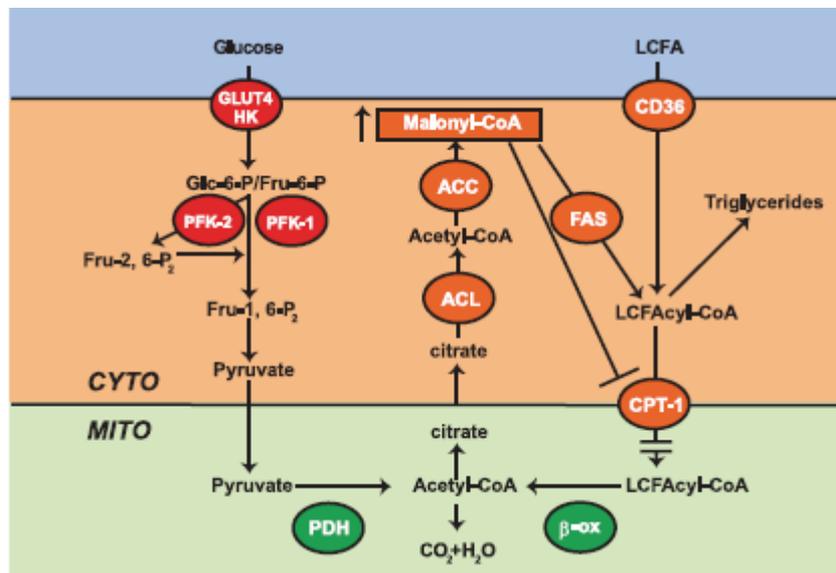


**Figure 13** : inhibition de l'utilisation du glucose par l'oxydation des acides gras, d'après Hué (Hue and Taegtmeier, 2009).

Cependant, la principale cible métabolique freinant l'oxydation du glucose n'est ni la captation de glucose dans la cellule, ni la formation de pyruvate au cours de la glycolyse mais bien l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie, sous la dépendance d'une enzyme, la pyruvate déshydrogénase (PDH), sur laquelle nous reviendrons (Figure 13).

Outre cette régulation initiale du flux d'oxydation du glucose par les AG, quelques années plus tard, en 1977, Jean Denis Mac Garry et Daniel Foster posèrent les bases d'une relation inverse, c'est-à-dire d'une inhibition de l'oxydation des AG par le glucose, centrée sur la régulation de la concentration en malonyl-CoA (McGarry, 1998, McGarry, et coll., 1977). Ainsi, lorsqu'existe une haute disponibilité en glucose, l'élévation des concentrations cytosoliques en citrate oriente celui-ci vers la synthèse des AG par une enzyme, l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), dont le produit est le malonyl-CoA, métabolite intermédiaire de la synthèse des AG et puissant inhibiteur de CPT-1 comme nous l'avons dit (Figure 14).

Encore un fois, si la disponibilité en AG peut participer à l'économie de glucose, la théorie du cycle glucose-AG ne dit pas que le facteur limitant à l'utilisation des AG est la disponibilité en AG.



**Figure 14** : inhibition de l'oxydation des acides gras par le glucose, d'après Hué (Hue and Taegtmeyer, 2009)

En ayant détaillé ces deux aspects du cycle AG-glucose et glucose-AG, on comprend mieux les bases biochimiques qui peuvent participer au développement d'une gluco-lipotoxicité, laquelle peut aggraver l'insulinorésistance. Ainsi, une élévation de la glycémie peut limiter l'oxydation des lipides ; cet excès de lipides pouvant alors limiter l'oxydation du glucose par la théorie classique de Randle. On peut aussi appliquer ce raisonnement en partant d'une élévation primitive des AGL. Cette compétitivité mutuelle glucose-AG n'explique évidemment pas toutes les conséquences de la lipotoxicité sur le défaut de l'utilisation de glucose qui limite non seulement l'oxydation directe du glucose mais aussi l'action de l'insuline (Delarue and Magnan, 2007) et participe ainsi au développement de l'insulinorésistance.

Cette interrelation entre glucose et AG maintenant posée, dictée bien sûr par l'environnement hormonal extracellulaire mais aussi par les lois biochimiques intracellulaires, met en jeu deux systèmes enzymatiques clés : d'une part celui de la PDH et d'autre part celui de CPT-1, lesquels régulent respectivement l'entrée du pyruvate et des AGLC dans la mitochondrie.

On distingue que, finalement, pour chacune des deux familles de substrats glucidiques ou lipidiques existe une molécule signal régulatrice négative du métabolisme de l'autre : ainsi pour les AG, il s'agit de la PDH et pour le glucose la cible en est l'ACC. C'est sur ces deux cibles que nous allons maintenant revenir plus en détail.

## 1. Rôle central de la PDH dans la balance AG-glucose

Ainsi, une inactivation de la PDH est enregistrée dans le muscle en réponse au jeûne, ou encore lors d'un régime riche en graisse c'est-à-dire dans l'ensemble des situations physiologiques ou pathologiques dans lesquelles on observe un frein à l'utilisation du glucose dans le muscle (Harris, et coll., 2002).

De façon plus fondamentale, l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie a d'ailleurs été identifiée comme un des points de contrôle majeur de la respiration enregistrée sur mitochondries isolées du muscle squelettique ou de myocarde (Rossignol, et coll., 2000).

### 1.1 Régulation de l'enzyme par son produit et les équivalents réduits

Il existe tout d'abord une régulation purement biochimique de la PDH pour laquelle le NADH et l'acétyl-CoA sont des inhibiteurs allostériques. Mais outre cette régulation par les

métabolites, la PDH est régulée de façon post-traductionnelle par un système de phosphorylation-déphosphorylation.

### 1.2 Régulation par phosphorylation-déphosphorylation

Ainsi la PDH est active sous forme déphosphorylée alors qu'elle est inhibée après phosphorylation.

#### a) Les kinases

Les pyruvate-déshydrogénases kinases (PDK) sont au nombre de trois isoformes (PDK-1, PDK-2 et PDK-4), chacune spécifique d'un des trois sites de phosphorylation de la PDH. Elles sont activées par l'augmentation du ratio  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ ,  $\text{ATP}/\text{ADP}$  et acétyl-CoA/CoA et inhibées par le pyruvate et le dichloroacétate.

#### b) Les phosphatases

Il existe deux isoformes de pyruvate-déshydrogénases phosphatases (PDP1 et PDP2) connues, nécessitant toutes deux du magnésium pour fonctionner. PDP1 est notamment activée par augmentation du calcium intracellulaire.

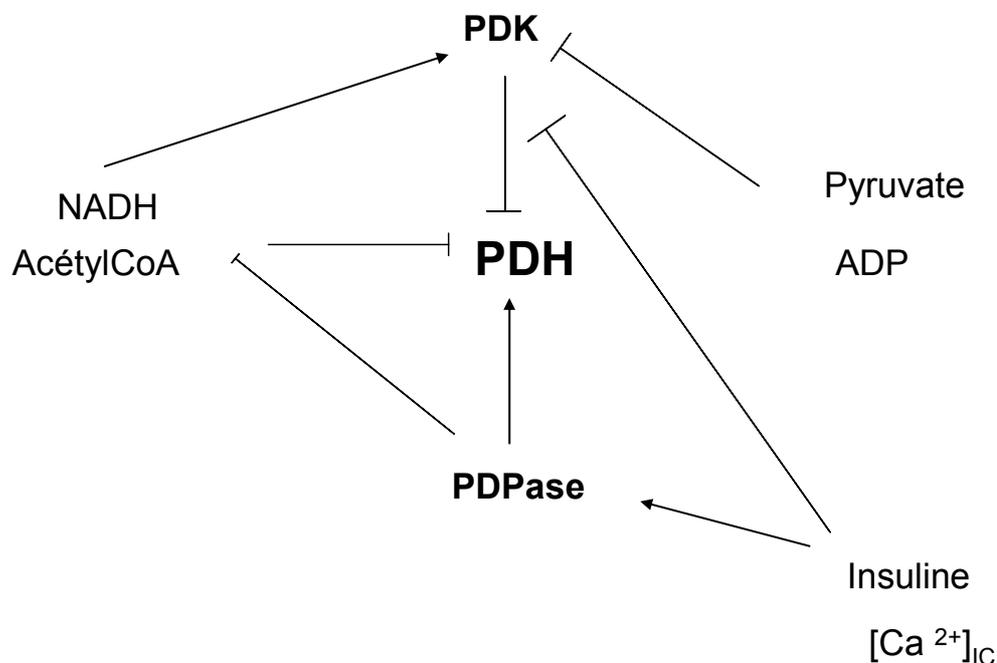
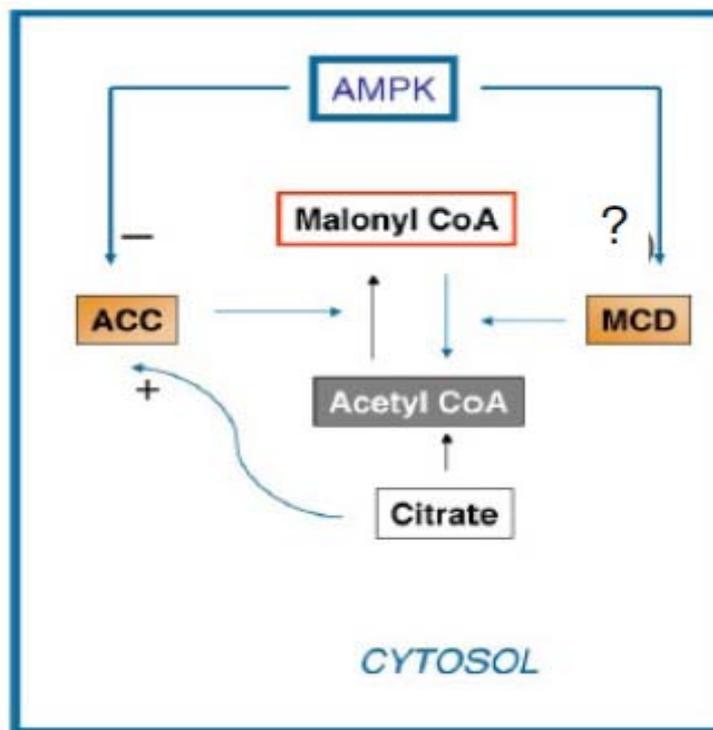


Figure 15 : principaux régulateurs de la PDH

Nous détaillerons par la suite le rôle essentiel par la signalisation des PPARs sur l'activité de la PDH qui passe par la régulation transcriptionnelle de PDK-4.

## 2. Régulation de la concentration en malonyl-CoA

Dans la cellule musculaire, la concentration en malonyl-CoA est finement régulée. Il est produit à partir de l'acétyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et dégradé par une autre enzyme, la malonyl-CoA déshydrogénase (MCD). L'activité de ces deux enzymes est régulée de façon très différente puisque l'ACC, tout comme la PDH, est essentiellement inactivée par phosphorylation notamment par l'AMP-activated protein kinase (AMPK), alors que la MCD est essentiellement régulée au niveau transcriptionnel. Cette dernière est une cible des PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) que nous détaillerons par la suite.



**Figure 16** : régulation de la concentration en malonyl-CoA au cours de l'exercice, d'après Kiens (Kiens, 2006).

*MCD : malonyl-CoA déshydrogénase ; ACC : acétyl-CoA carboxylase.*

### ***D. Régulation intrinsèque à la mitochondrie***

Outre le contrôle de l'entrée du pyruvate, Rossignol a identifié la chaîne respiratoire comme point de régulation et de contrôle de la phosphorylation oxydative dans les muscles, justifiant le fait de s'intéresser aux propriétés intrinsèques de la mitochondrie et au rôle potentiel porté par la mitochondrie elle-même dans le choix de substrats (Rossignol, et coll., 2000).

Ainsi, des travaux de Xavier Leverve ont montré l'importance du potentiel de membrane dans l'utilisation préférentielle de substrats (Leverve, 2007).

#### 1. Les équivalents réducteurs et les déshydrogénases

Comme nous l'avons vu, l'énergie nécessaire pour produire l'ATP provient des équivalents réducteurs produits par l'oxydation des substrats. Selon l'origine du substrat, le bilan en équivalents réducteurs est bien différent ; la transformation du glucose en acétylCoA ne fournissant que des NADH alors que la  $\beta$ -oxydation les AG génère autant de molécules de NADH que de FADH<sub>2</sub>. Ainsi, selon le potentiel de membrane, on pourra faciliter plus ou moins le flux en NADH ou FADH et donc indirectement les glucides ou les lipides (Leverve, 2007). Un potentiel de membrane élevé favoriserait l'utilisation des hydrates de carbone en facilitant le transport intramitochondrial des NADH issus de la glycolyse alors qu'un faible potentiel de membrane faciliterait l'utilisation des AG dont le transport, s'il est limité par CPT-1 pour les AGLC, ne nécessite pas de transfert d'équivalents réduits et n'est donc pas influencé par le gradient de protons.

D'autre part, il est possible que, dans certaines conditions, la mitochondrie puisse moduler son tropisme pour les NADH en fonction de leur origine, qu'ils soient issus de la  $\beta$ -oxydation ou de la glycolyse (Hue and Taegtmeyer, 2009). Des théories pour l'instant encore très abstraites développent l'hypothèse de l'existence de « supercomplexes » de la chaîne respiratoire associant par exemple les complexes I et II, favorisant ainsi l'utilisation des AG, alors que l'association des complexes I et III favoriserait les autres substrats (Acin-Perez, et coll., 2008, Boekema and Braun, 2007). Si notre vision de la chaîne respiratoire est probablement trop statique et ne tient pas assez compte de la fluidité membranaire et des mouvements des complexes au sein de cette membrane permettant un réagencement de ces derniers, il est encore difficile d'objectiver ces phénomènes en temps réel.

## 2. L'oxygène et la cytochrome c-oxydase (COX)

La COX, accepteur final d'électrons de la chaîne respiratoire, est une enzyme cruciale pour la respiration mitochondriale. Elle fait partir du complexe IV de la chaîne respiratoire et permet de catalyser la réaction suivante :

$2 \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- \Rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$ . Cette réaction représente une étape participant à la limitation de la vitesse de la phosphorylation oxydative. Ainsi est-il capital que la pression partielle en  $\text{O}_2$  ( $\text{pO}_2$ ) au niveau du microenvironnement cellulaire satisfasse les conditions cinétiques et thermodynamiques pour le bon fonctionnement de la respiration mitochondriale. Cependant, si la mitochondrie est effectivement exposée à des baisses importantes de  $\text{pO}_2$ , cet organe est conçu pour être opérant dans de telles conditions puisque la consommation d'oxygène, et donc la baisse de  $\text{pO}_2$ , est inhérente à son fonctionnement propre.

Cependant, lors d'un exercice à  $\text{VO}_2\text{max}$ , il est connu que la  $\text{pO}_2$  au niveau du cytochrome-c est très faible (<1kPa), juste au-dessus des valeurs où les mitochondries isolées (Gnaiger, 2001) commencent à être limitées en oxygène, pouvant expliquer la réduction de la respiration mitochondriale maximale (Richardson, et coll., 1995). Ainsi, la  $\text{pO}_2$  intracellulaire atteinte au cours d'un exercice intense approche le niveau de limitation de la respiration cellulaire *in vivo*. Même si une exposition systémique à une hypoxie environnementale diminue certainement assez peu la  $\text{pO}_2$  tissulaire (Richardson, et coll., 2006) du fait des multiples adaptations cardio-circulatoires et hématologiques intermédiaires, ceci pourrait être suffisant pour perturber le fonctionnement mitochondrial.

Or, si la quantité d'énergie par gramme de lipide oxydé est plus importante que pour un gramme de glucide, la quantité d'énergie produite rapportée au volume d'oxygène consommé est plus importante lors de l'oxydation des glucides que des lipides. Ainsi l'équivalent énergétique est de 5,19 kcal/litre d'oxygène consommé en présence de glucose et de seulement 4,81 kcal/litre d'oxygène consommé en présence de palmitate. Cette observation est utilisée en physiologie pour déterminer la nature du substrat oxydé par les variations du quotient respiratoire (rapport entre  $\text{CO}_2$  produit et  $\text{O}_2$  consommé) mesuré en calorimétrie indirecte: il est de 0,7 pour les lipides contre 1 pour les glucides.

Ces modulations biochimiques et mitochondriales qui influencent le choix de substrat préférentiellement oxydé ont récemment été reprises dans une excellente revue de question (Hue and Taegtmeyer, 2009).

## Chapitre II. Les acteurs moléculaires de l'orientation métabolique

### I. L'AMPK

#### A. Généralités

L'AMP-activated protein kinase (AMPK) est une protéine qui est apparue comme le senseur du statut énergétique cellulaire (Hardie, 2008). Cette kinase est activée par les perturbations du statut énergétique cellulaire, en particulier l'évolution du rapport AMP/ATP, mais aussi par certaines hormones telles que la leptine ou l'adiponectine. Il existe à l'heure actuelle deux grandes voies impliquées dans l'activation de l'AMPK. La voie du déficit énergétique, dépendante de l'AMP et impliquant la kinase LKB-1 (encore appelée STK11 pour « Sérine-Thréonine Kinase 11 »), suppresseur de tumeur, et l'autre impliquant les mouvements de calcium cellulaire *via* l'activation des CaMKinases (calcium/calmoduline-dependent protein kinase- kinase  $\beta$ ).

Alors que l'insuline est une hormone du stockage énergétique, l'activation de l'AMPK vise au contraire à limiter toutes les voies de stockage de l'énergie et de synthèse cellulaire tout en induisant les voies de production de l'énergie, depuis la captation jusqu'à l'oxydation des substrats énergétiques par la cellule en demande.

Nous nous intéresserons maintenant plus particulièrement aux cibles de l'AMPK sur le métabolisme des différents substrats et plus particulièrement celui des AG (Thomson and Winder, 2009).

#### B. Les cibles de l'AMPK

##### 1. La captation des substrats dans la cellule

###### 1.1 Translocation de Glut-4

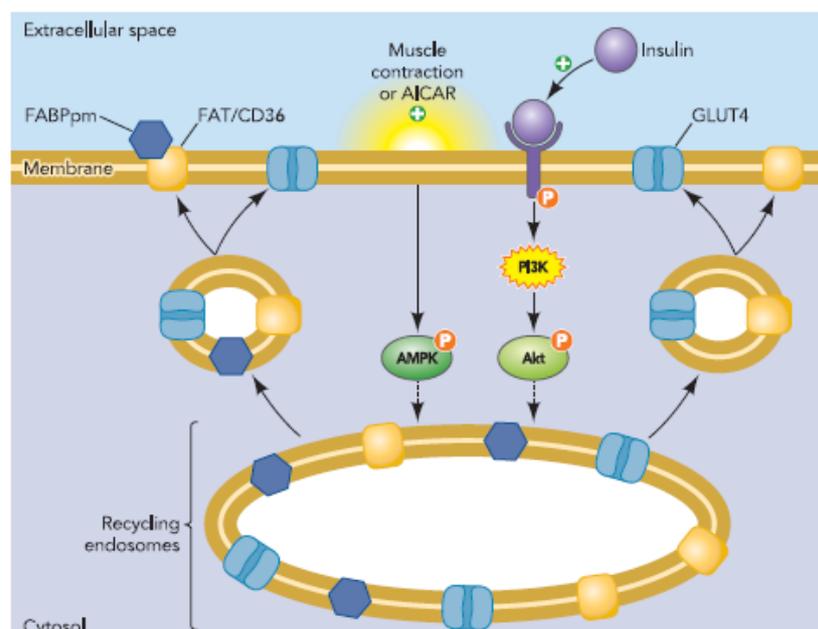
Un des premiers rôles identifiés à l'AMPK résidait dans la facilitation de la captation du glucose par la cellule musculaire par translocation à la membrane du pool cytosolique de transporteurs Glut-4. De plus, l'AMPK est un puissant activateur de la PFK-1, ce qui

augmente le turn-over de glucose-6P et limite donc l'inhibition de l'hexokinase par son produit, entretenant ainsi un flux élevé de glucose à travers les transporteurs Glut-1, non insulinodépendants. Aussi l'AMPK assure directement ou indirectement une optimisation de la captation du glucose par l'ensemble des transporteurs membranaires.

### 1.2 Translocation de Fat CD36 à la membrane

Si l'AMPK stimule la captation du glucose dans la cellule, elle fait de même avec les AG. En effet, l'AMPK permet la translocation de Fat CD36 au sarcolemme (Chabowski, et coll., 2005), facilitant ainsi l'entrée des AG dans la cellule musculaire (Thomson and Winder, 2009). Néanmoins cette étape de transport membranaire des AGLC n'est certainement pas limitante d'une utilisation maximale des AG et ne présage pas du devenir des AG une fois pénétrés dans le cytosol.

Ceci est d'ailleurs très bien illustré par la figure 17 extraite d'une revue de question sur la régulation du transport membranaire des AG. Ainsi, deux voies totalement antagonistes, celle de l'insuline qui conduit au stockage des AG et celle de l'AMPK qui participe au contraire au déstockage des TG, entraînent pourtant toutes deux une augmentation des capacités de transport membranaire des AG par la translocation de Fat CD36 à la membrane sarcolemmale.



**Figure 17 :** induction de la translocation du pool cytosolique des transporteurs Fat CD36 à la membrane sarcolemmale sous l'effet de l'activation de l'AMPK et de l'insuline, d'après Bonen (Bonen, et coll., 2007).

## 2. L'oxydation des AG

### 2.1 L'ACC et le malonyl-CoA

Comme nous l'avons vu précédemment, l'ACC est l'enzyme donnant naissance au malonyl-CoA, à partir de l'acétyl-CoA en excès. S'il existe une régulation allostérique de l'ACC activée par le citrate, l'activité de cette enzyme est aussi modulée par son état de phosphorylation : active sous la forme déphosphorylée et inactive après phosphorylation. L'AMPK, en phosphorylant l'ACC, la rend inactive, diminue ainsi la synthèse de malonyl-CoA qui libère l'activité enzymatique de CPT-1, permettant l'entrée des acylCoA dans la mitochondrie où ils subiront la  $\beta$ -oxydation.

### 2.2 Un rétrocontrôle négatif par les AG

Néanmoins, si l'AMPK semble faciliter le flux d'AGL du plasma jusqu'à la mitochondrie, il faut aussi remarquer l'existence probable d'un rétrocontrôle négatif exercé par les AGL sur l'activation de l'AMPK. Si ce rétrocontrôle semble évident pour le glucose qui s'accompagne d'une diminution du rapport AMP/ATP, ceci est moins évident pour les AGL. Ainsi, lors d'une épreuve de jeûne, le blocage de l'élévation des AGL par l'acide nicotinique permet d'entretenir une activation plus prolongée et plus élevée de l'AMPK (de Lange, et coll., 2006).

Alors qu'une baisse de la glycémie stoppe naturellement l'activation de l'AMPK chez le sujet sain, le défaut de captation du glucose par la cellule devrait mimer la même activation cellulaire en réponse, même s'il existe une hyperglycémie. Or, force est de constater qu'au contraire, chez les sujets obèses ou insulinorésistants, existe un défaut relatif d'activité AMPK (Sriwijitkamol, et coll., 2006), (Liu, et coll., 2006).

## 3. L'AMPK : activateur de la biogenèse mitochondriale

Indifféremment de la nature du substrat, l'AMPK est aussi un activateur du facteur de transcription PGC-1  $\alpha$ , impliqué dans la biogenèse mitochondriale (Ruderman, et coll., 2003). Ainsi l'AMPK peut induire transcriptionnellement PGC-1 $\alpha$  (Terada, et coll., 2002) par au moins deux moyens : d'une part l'activation de CREB (AMP response element binding protein) et d'autre part celle de Mef-2 (myocyte enhancer factor-2) (Freyssenet, 2007). Enfin

l'AMPK agit aussi de façon post-traductionnelle par phosphorylation de PGC-1 $\alpha$ , augmentant ainsi son efficacité transcriptionnelle (Jager, et coll., 2007).

Si l'AMPK favorise la fourniture d'énergie, il ne semble pas exister de spécificité concernant la nature du substrat utilisé. Ainsi, une situation de déficit énergétique cellulaire ne privilégierait pas un substrat aux dépens d'un autre au niveau cellulaire mais permettrait de maintenir une oxydation conjointe des AG et du glucose. Le cycle de Randle ne semble donc plus un élément régulateur majeur sur le flux de substrat à partir du moment où l'AMPK est activée (Hue and Taegtmeyer, 2009); la gestion de la « crise énergétique » étant prépondérante sur le choix de substrats.

*Au total, la phosphorylation de l'AMPK ne peut, à elle seule, expliquer l'utilisation préférentielle de substrat glucido-lipidique, ou l'épargne de substrat glucidique au profit d'organes gluco-dépendants. L'AMPK serait permissive de l'utilisation de substrats et notamment des AG, mais au-delà de toute préférence métabolique ; l'important étant la fourniture d'énergie quelle qu'en soit son origine. Il faut donc envisager d'autres acteurs capables de médier cette orientation préférentielle entre substrats.*

## II. Les PPARs

### *A. Généralités sur les PPARs et conséquences sur le métabolisme des AG*

Les PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) sont des facteurs de transcription appartenant à la famille des récepteurs nucléaires. Trois isoformes de PPARs existent chez les mammifères, qui se différencient par leurs fonctions biologiques et leur répartition tissulaire, PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$  et PPAR- $\delta$  (autrefois appelé PPAR- $\beta$ ). L'isoforme  $\alpha$  est exprimée dans les tissus à haut flux métabolique, comme le cœur et le foie. L'isoforme  $\delta$  est présente de manière ubiquitaire dans l'organisme, avec un niveau d'expression important dans les muscles squelettiques.

#### 1. Les AGL, des ligands naturels des PPARs

Les AG en sont les ligands naturels des PPARs qui apparaissent maintenant comme les médiateurs potentiels d'une signalisation métabolique propre aux AG ; Evans a d'ailleurs qualifié les PPARs de « lipid sensor » (Evans, et coll., 2005). Aussi, la réponse au jeûne qui

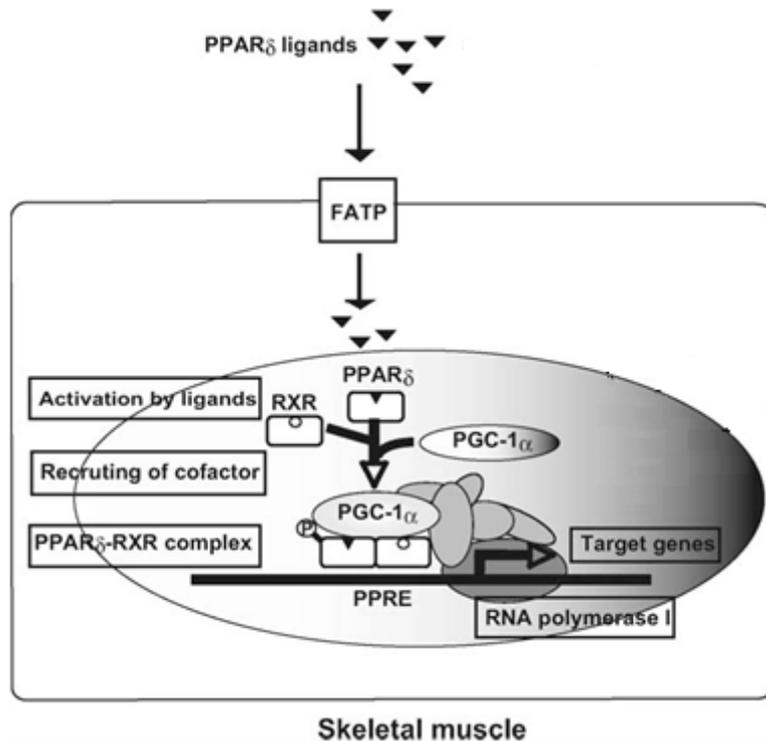
augmente la disponibilité en AGL a souvent été utilisée comme modèle d'étude d'activation naturelle des PPARs, situation sur laquelle nous reviendrons ultérieurement.

L'industrie pharmaceutique a multiplié depuis une dizaine d'années des « agonistes » pharmacologiques plus ou moins spécifiques de chaque isoforme. Ce terme présent partout dans la littérature est un peu abusif, puisque ces agents pharmacologiques sont, au sens strict du terme, des ligands pharmacologiques des PPARs mais ne peuvent en aucun cas à eux seuls garantir une activation de la transcription par les PPARs qui dépendra du contexte d'emploi de ces molécules.

Ainsi, les fibrates, utilisés dans le traitement des dyslipidémies, sont des ligands pour PPAR- $\alpha$ . Les glitazones, utilisées dans le traitement du diabète de type 2, sont des ligands pour PPAR- $\gamma$ . Il n'existe à l'heure actuelle aucune molécule ayant l'autorisation de mise sur le marché en tant que ligands spécifiques de PPAR- $\delta$ . Ces molécules, le GW 501516 et le GW 742, sont néanmoins l'objet de recherches actives pas le laboratoire Glaxo Smith Klein. Notons ici que le bezafibrate, utilisé depuis plus de 30 ans dans le traitement de l'hypercholestérolémie, est un pan-agoniste des trois isoformes de PPARs.

## 2. Dimérisation avec RXR

Une fois activé par un ligand naturel (les acides gras par exemple) ou exogène (une molécule pharmacologique), le facteur de transcription PPAR est capable de former un hétérodimère avec le récepteur de l'acide rétinoïque (RXR) et de se fixer sur des séquences d'ADN à motif très conservé, appelées élément de réponse aux PPAR ou PPRE pour « Peroxisome Proliferator Response Element ». Ces séquences de fixation sur l'ADN sont extrêmement conservées d'une isoforme à l'autre et présentent une homologie de plus de 85% (Ehrenborg and Krook, 2009) Figure 18.



**Figure 18** : activation des PPAR- $\delta$ , d'après Takahashi (Takahashi, et coll., 2006)

### 3. Les cofacteurs régulateurs des PPARs

Cependant, la liaison de PPARs sur le promoteur de leurs gènes cibles n'est pas suffisante pour activer leur transcription. En effet, en l'absence de cofacteurs, l'hétérodimère est réprimé par la présence notamment des histones déacétylases.

Ainsi, des co-facteurs activateurs sont nécessaires pour activer l'hétérodimère PPAR/RXR, et permettre la fixation de l'ARN polymérase 1 pour initier la duplication de l'ADN en ARNm. Le plus connu d'entre eux, initialement identifié pour l'isoforme PPAR- $\gamma$ , est PGC-1 $\alpha$ . Depuis, plusieurs études ont démontré, par immunoprécipitation, son étroite relation avec PPAR- $\delta$  (Wang, et coll., 2003) et leur action synergique (Dressel, et coll., 2003).

Il existe de nombreux autres cofacteurs (Yu and Reddy, 2007) comme CBP/p3000, steroid receptor coactivator (SRC1), qui présentent une activité histone acétylase et remodelent la structure de la chromatine. Un autre groupe de coactivateurs, les TRAP220 ou PPAR binding protein, forme un pont entre la machinerie transcriptionnelle et les PPARs.

#### 4. Modulation post-transcriptionnelle

Cependant, l'activation de la voie des PPARs n'est pas exclusivement liée à la l'activation par les AGL ni même à la présence de cofacteurs de transcription modulant l'efficacité des PPARs sur leurs gènes cibles. Outre leur activation par des ligands naturels, ces facteurs de transcription possèdent une régulation post-transcriptionnelle très complexe et encore mal connue. Ainsi la phosphorylation par MAPKinases (mitogen-activated protein kinases, ERK- and p38-MAPK), les protéines kinases A et C, la glycogène synthase kinase-3 (GSK-3) ou même l'AMPK peut affecter l'activité de ligation au substrat, à l'ADN ou aux cofacteurs de transcription (Burns and Vanden Heuvel, 2007).

##### ***B. Phénotype métabolique et PPARs***

Il a été montré que PPAR-  $\delta$  jouait un rôle important dans le transport des acides gras et leur oxydation dans le muscle, ainsi que dans le contrôle de la glycémie (Takahashi, et coll., 2006).

Ainsi, lorsque PPAR-  $\delta$  est surexprimé dans le muscle, on observe une transition des fibres musculaires vers un phénotype plus oxydatif (Lunde, et coll., 2007, Luquet, et coll., 2003) avec une augmentation des capacités oxydatives d'autant plus marquée que le muscle est glycolytique. D'autre part, ces souris présentent une diminution de leur masse grasse avec des adipocytes plus petits (Luquet, et coll., 2003).

##### 1. Résistance à l'obésité

Dans un autre modèle de souris surexprimant une forme constitutionnellement active de PPAR- $\delta$ , ces souris sont résistantes au développement d'une obésité et d'une insulino-résistance au cours d'un régime riche en graisses (Wang, et coll., 2004).

##### 2. Bilan métabolique et dyslipidémie

A contrario, chez des souris déficientes pour PPAR- $\delta$ , une diminution du métabolisme basal, de la production de chaleur, et de la tolérance à un test de charge en glucides est observée (Lee, et coll., 2006). Cependant, ces nombreuses études centrées sur le rôle physiologique des

PPARs ont été réalisées en ayant recours à des modèles animaux génétiquement modifiés pour lesquels il est toujours délicat de juger des effets physiologiques des protéines dont les gènes qui les codent sont soit invalidés, soit considérablement surexprimés. Aussi, nous sommes-nous intéressés aux effets décrits par l'administration in vivo d'un agoniste PPAR- $\delta$  (GW 501516).

En dehors de toute manipulation génique, l'activation pharmacologique de PPAR- $\delta$  induit une augmentation de l'oxydation des acides gras en modulant la transcription de nombreux gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des acides gras ; ces propriétés ont particulièrement bien été montrées sur des modèles murins d'obésité (Tanaka, et coll., 2003). Chez le singe, une correction de la dyslipidémie a pu être mise en évidence (Oliver, et coll., 2001). Très peu d'études sont encore disponibles chez l'Homme, au cours desquelles les auteurs évaluent les effets potentiellement bénéfiques du GW 501516 sur le syndrome métabolique. Les résultats obtenus démontrent que, chez des patients porteurs d'un syndrome métabolique et maintenus sédentaires, deux semaines d'administration du GW 501516 permettaient d'améliorer certains paramètres biologiques représentatifs du dysmétabolisme (Riserus, et coll., 2008, Sprecher, et coll., 2007).

Enfin, l'étude de nombreux polymorphismes s'est mise en place depuis quelques années sans qu'il ait été pour l'instant fait de lien direct entre un polymorphisme et le développement d'un syndrome métabolique, d'une obésité ou d'un diabète de type 2. Par contre, ceux-ci pourraient influencer notablement la susceptibilité aux facteurs environnementaux notamment à la sédentarité et l'excès alimentaire (Ehrenborg and Krook, 2009).

### 3. Flexibilité métabolique

Les souris déficientes pour PPAR- $\delta$ , qui présentent une résistance à l'obésité, présentent aussi une flexibilité métabolique diminuée avec un quotient respiratoire un peu abaissé (Lee, et coll., 2006). Lors d'une étude par spectroscopie RMN avec substrats marqués, la proportion d'AG oxydés augmente alors que l'oxydation glucidique diminue dans le muscle soléaire de rats traités durant 7 jours avec un agoniste PPAR- $\delta$  (Jucker, et coll., 2007).

#### 4. Mitochondrie et PPARs

Sur la base de ces résultats, on pouvait dès lors formuler l'hypothèse que les agonistes PPAR- $\delta$  pouvaient affecter la quantité et/ou la fonctionnalité des mitochondries. Les mécanismes par lesquels le GW 501516 augmente l'utilisation des acides gras ont été en partie abordés au cours d'une étude très récente réalisée sur culture de myoblastes ; les résultats confirment que l'agoniste PPAR- $\delta$  majore l'oxydation des acides gras, et que ce sont principalement les systèmes de transport des acides gras qui semblent affectés transcriptionnellement, sans augmentation détectable des gènes régulateurs de la biogenèse mitochondriale ou codant des protéines de structure de la mitochondrie, de la chaîne de transfert des électrons ou du cycle de Krebs (Kleiner, et coll., 2009). On doit cependant noter que, contrairement à ce que peut laisser penser le titre de l'article publié, on ne connaît rien des effets de cet agoniste sur le fonctionnement mitochondrial et sur l'affinité propre de la mitochondrie pour les acides gras, facteurs qui pourraient eux aussi expliquer l'augmentation de l'oxydation de ce type de substrat. Il existe pour l'instant une seule étude disponible sur l'utilisation de substrats par les mitochondries de muscles squelettiques au cours d'un traitement par agoniste PPAR- $\delta$ , qui ne montre aucune modification particulière de l'oxydation maximale des différents substrats par les mitochondries isolées (Constantin, et coll., 2007). Ceci est d'autant plus surprenant qu'existe une augmentation spécifique de l'activité 3-HAD. Néanmoins, la durée de traitement, restreinte à huit jours, est insuffisante pour conclure définitivement à l'absence de régulation de la fonction mitochondriale par PPAR- $\delta$ .

#### ***C. Les cibles transcriptionnelles des PPARs impliquées dans le métabolisme des AG***

Même s'il est encore difficile à l'heure actuelle d'identifier des cibles transcriptionnelles spécifiques à chaque isoforme de PPARs notamment en raison de la grande homologie des séquences de liaison à l'ADN, nous nous efforcerons de montrer comment ces récepteurs nucléaires sont en mesure de moduler le flux d'AG dans la cellule musculaire. Ceci peut sembler un peu théorique, et il faudra bien entendu toujours replacer l'existence d'une induction transcriptionnelle *in vitro* dans le contexte d'une situation physiologique puisque les principaux régulateurs de la transcription vont dépendre des cofacteurs présents et recrutés dans la situation donnée.

En 2003, Tanaka réalise les premières analyses en RT-PCR sur muscles de rats traités une semaine par un agoniste PPAR- $\delta$  et obtient des résultats qui semblent confirmer le rôle régulateur de ce facteur sur le métabolisme des lipides (Tanaka, et coll., 2003). Il montre ainsi une augmentation des ARN messagers de FATP et CPT-1, impliqués dans le transport des acides gras, et de LCAD et 3-HAD, enzymes de la  $\beta$ -oxydation. Nous allons maintenant passer en revue ces différentes cibles.

### 1. Transport membranaire

Il a récemment été montré que PPAR- $\delta$  était capable d'induire la transcription de Fat CD36 (Nahle, et coll., 2008), augmentant ainsi le pool cytosolique. Outre cette régulation transcriptionnelle, une translocation à la membrane de FABPpm et Fat CD36 a été décrite dans le myocarde sous l'effet d'agonistes PPAR- $\alpha$  et  $\delta$  (Kalinowska, et coll., 2009).

### 2. Transport mitochondrial

#### 2.1 Expression du gène CPT-1

Liu et coll. montrent que l'induction transcriptionnelle du gène CPT-1 dans les situations où la disponibilité en AG augmente (jeûne, régime riche en graisse ou encore diabète) est directement liée aux AG qui se fixent sur la séquence de réponse aux AG du promoteur (FARE pour fatty acid responsive element) (Liu, et coll., 2007). D'abord identifié comme cible de PPAR- $\alpha$  (Mascaro, et coll., 1998), l'induction par l'isoforme PPAR- $\delta$  du gène CPT-1 a été prouvée in vitro par Dressel (Dressel, et coll., 2003).

#### 2.2 Régulation de la concentration en malonyl-CoA via MCD

La malonyl-CoA déshydrogénase, qui tend à faire diminuer les concentrations en malonyl-CoA est également un gène cible de PPAR- $\alpha$  (Campbell, et coll., 2002).

#### 2.3 Expression du gène CPT-2

Récemment, il a pu être montré qu'un pan-agoniste PPAR, le bézafibrate, pouvait améliorer l'activité CPT-2 et le niveau d'oxydation des AG chez des patients porteurs d'un déficit de la fonction CPT-2 (Bonfont, et coll., 2009). En étudiant des cellules musculaires de ces patients, la même équipe avait pu montré que seul un agoniste PPAR- $\delta$  était capable d'induire

la transcription du gène CPT-2 et d'améliorer l'activité enzymatique mesurée in vitro ; alors qu'un agoniste sélectif PPAR- $\alpha$  restait sans effet notable sur CPT-2 (Djouadi, et coll., 2005).

#### 2.4 Transport mitochondrial de Fat CD36

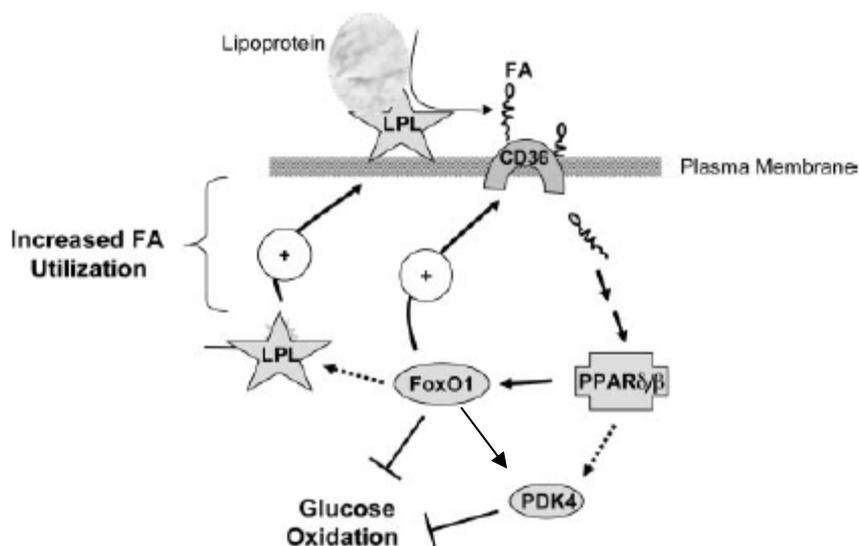
Sans compter l'augmentation du pool cytosolique, les PPARs sont capables de moduler la translocation de ce pool. Contrairement aux agonistes PPAR- $\alpha$  et  $\delta$  qui permettent une redistribution au sarcolemme du pool cytosolique de Fat CD36, un agoniste PPAR $\gamma$ , la rosiglitazone a été récemment décrite comme capable d'induire la redistribution de ce pool cytosolique à la membrane mitochondriale. Ceci s'accompagne d'une augmentation concomitante de l'oxydation mitochondriale en palmitate de 25% et sans modulation associée de l'activité CPT-1 (Benton, et coll., 2008). Outre le rôle propre d'un agoniste PPAR- $\gamma$ , cette étude renforce l'idée d'une régulation possible de l'oxydation des AGLC indépendamment de CPT-1.

*Ainsi, il existe bien une régulation de la transcription des gènes impliqués dans le transport membranaire et mitochondrial des AG sous l'effet des facteurs de transcription PPARs. Néanmoins, l'intensité respective sur ces deux transports membranaires et mitochondriaux n'est pas connue. Existe-t-il une parfaite coordination entre eux ou bien le transport membranaire est-il plus augmenté que le transport mitochondrial ? La question est d'importance car les conséquences fonctionnelles peuvent en être opposées. Ainsi, il a été montré que dans le muscle de rats obèses, les transports des AG étaient augmentés aux deux niveaux mais de façon non proportionnelle ; le transport membranaire étant nettement plus amélioré que le transport mitochondrial, aboutissant au total à une augmentation du stockage des AG dans la cellule musculaire (Holloway, et coll., 2009). D'autre part, aucune étude ne s'est intéressée à la modulation du transport carnitine palmitoyltransférase-carnitine translocase et n'a pour l'instant comparé le transport d'un AGLC dépendant de CPT-1 ou pas.*

### 3. Régulation de la PDH via PDK-4

Lors d'un jeûne chez le rongeur, une induction de PDK-4 est observée de façon constante dans le muscle. Cependant, cette réponse persistant même en l'absence du facteur de transcription PPAR- $\alpha$  (Holness, et coll., 2002), le rôle des PPARs a pendant un temps été mis en doute. Néanmoins, dans ce cas de figure, l'activité PPAR- $\delta$  persistant, elle a tout à fait pu compenser l'ablation de PPAR- $\alpha$  ; tout au moins dans le tissu musculaire où PPAR- $\delta$  est largement coexprimé au côté de PPAR- $\alpha$ . Depuis, le gène PDK-4 a été clairement identifié comme une cible directe et spécifique de PPAR- $\delta$  (Degenhardt, et coll., 2007).

Outre cette activation directe de PDK-4 par PPAR- $\delta$ , il existe un phénomène de renforcement par une voie indirecte. Ainsi, il a récemment été montré que FoxO-1 était une cible spécifique de PPAR- $\delta$  (Nahle, et coll., 2008). Or FoxO-1 est également un puissant activateur de la transcription de PDK-4 (Furuyama, et coll., 2003) et induit la translocation de FatCd36 à la membrane (Bastie, et coll., 2005). Ceci peut donc aboutir à une véritable boucle d'autoamplification de la transcription de PDK-4 par le complexe PPAR- $\delta$ -AG- FoxO-1.



**Figure 19** : amplification de la captation et de l'oxydation des AG par une boucle de rétrocontrôle positif liant Fat CD36, PPAR- $\delta$  et FoxO-1, adapté d'après Nahle (Nahle, et coll., 2008).

Cette activation de PDK-4 a été retrouvée *in vivo* après 7 jours de traitement par un agoniste PPAR- $\delta$  (Constantin, et coll., 2007); elle s'accompagne d'une diminution de l'activité de la PDH (Constantin-Teodosiu, et coll., 2009). Même s'il existe un certain nombre d'arguments

pouvant l'évoquer, la baisse de l'oxydation mitochondriale du pyruvate n'a été clairement montrée dans aucune de ces deux études.

Ainsi, l'activation de PPAR- $\delta$  est en mesure d'inhiber la PDH en activant la transcription de PDK-4. Cependant, le retentissement métabolique sur l'oxydation du pyruvate n'a pour l'instant pas été montré.

#### 4. $\beta$ - oxydation mitochondriale des AG par elle-même

Il a pu être montré une augmentation du messager de thioestérase mitochondriale (MTE-1) après activation de PPAR- $\delta$  au cours du jeûne (de Lange, et coll., 2006). De plus, l'activité de la 3-HAD apparaît doublée dans le muscle soléaire après une semaine de traitement par agoniste PPAR- $\delta$  (Constantin, et coll., 2007).

#### ***D. Existe-t-il une spécificité des réponses à PPAR- $\alpha$ et PPAR- $\delta$ ?***

Comme nous l'avons montré ci-dessus, les preuves de la spécificité d'induction d'une cible par l'une ou l'autre des deux isoformes manquent souvent. Même s'il existe des arguments forts concernant l'action spécifique de PPAR- $\delta$  sur la transcription de CPT-2 (Bonfont, et coll., 2009, Djouadi, et coll., 2005), les arguments concernant l'induction spécifique des autres gènes sont plus discutables ; notamment les travaux de Dressel sur CPT-1 ou ceux de Nahlé sur la boucle PPAR- $\delta$ -FoxO-1-PDK-4.

En effet, ces deux dernières études qui détaillent les mécanismes de transcription n'existent qu'*in vitro* et utilisent le plus souvent des montages génétiques sophistiqués ; ce qui est assez éloigné de l'induction transcriptionnelle *in vivo* dans l'environnement hormonal et métabolique d'un organisme entier.

Plusieurs moyens ont été utilisés pour répondre à cette question, notamment par des modèles de souris déficientes pour ces 2 isoformes PPAR-s. Mais là encore, la situation est loin d'être à sens unique. Ainsi, si l'équipe de Harris a montré, au moins chez le rongeur à travers un modèle de souris déficiente pour PPAR- $\alpha$ , que ce facteur de transcription était indispensable à la mise en place de la réponse métabolique au jeûne notamment via l'induction de PDK-4

(Wu, et coll., 2001) et de CPT-1, l'équipe d'Holness a trouvé des résultats contradictoires excluant un rôle fondamental pour PPAR- $\alpha$  (Holness, et coll., 2002, Masternak and Bartke, 2007). De même, dans un modèle de délétion simple ou multiple de PPAR- $\alpha$  et  $\delta$ , le rôle crucial pour le maintien du phénotype métabolique musculaire semble dévolu à l'isoforme  $\alpha$  dont les effets de la délétion ne sont ni compensés ni aggravés respectivement par la préservation ou la délétion conjointe de l'isoforme  $\delta$  (Bedu, et coll., 2007). Au contraire, une étude antérieure avait montré un niveau d'oxydation en oléate conservé dans les muscles de souris déficientes pour PPAR- $\alpha$  (Muoio, et coll., 2002). De plus, la réponse au jeûne de ces souris n'était altérée que de 25% concernant l'augmentation de l'oxydation en oléate, et l'induction transcriptionnelle de PDK-4 était même complètement préservée. Cette dernière étude tend à faire du carrefour métabolique de la PDH, une cible contrôlée particulièrement par l'isoforme  $\delta$  et évoque une suppléance de l'isoforme PPAR- $\alpha$  par l'isoforme PPAR- $\delta$  dans le muscle squelettique (Muoio, et coll., 2002).

Enfin, l'isoforme  $\delta$  qui est plus exprimée dans le muscle squelettique que l'isoforme  $\alpha$  (Escher, et coll., 2001) peut favoriser le rôle de PPAR- $\delta$  par rapport à celui de PPAR- $\alpha$  dans le muscle squelettique. Cet argument reste cependant relativement maigre et ne fait pas office de preuve.

Au total, les données de la littérature évoquent un rôle spécifique de PPAR- $\delta$  sur l'induction de CPT-2 et de PDK-4 dans le muscle squelettique.

***Ainsi, l'implication de PPAR- $\delta$  dans la régulation du métabolisme des lipides est fortement suggérée par les données de la littérature. Ce serait cependant conclure un peu vite que de se contenter des modulations de ses cibles transcriptionnelles. La question d'un retentissement fonctionnel sur le métabolisme mitochondrial en réponse à ces modulations transcriptionnelles reste encore en grande partie sans réponse. Quelles sont les étapes du métabolisme des AG contrôlées véritablement par PPAR- $\delta$  ? S'agit-il d'étapes en amont de la mitochondrie ou intrinsèques à la mitochondrie ?***

***Par ailleurs, l'isoforme PPAR- $\delta$  pourrait jouer un rôle particulier dans l'orientation métabolique par la régulation de PDK-4. En effet, cette kinase régule négativement la PDH qui reste un carrefour métabolique guidant en partie l'origine de l'acétyl-CoA qui sera oxydé dans la mitochondrie. Néanmoins, l'implication de PPAR- $\delta$  dans des situations physiologiques modulant une utilisation préférentielle des substrats n'a fait l'objet d'aucune étude.***

### **III. La membrane mitochondriale : conductance protonique et protéines « découplantes »**

Nous avons vu précédemment l'importance du potentiel de membrane dans l'utilisation préférentielle de substrats (Leverve, 2007). Aussi toute modulation de ce dernier et notamment toute fuite protonique qui tend à abaisser le potentiel de membrane pourra retentir sur le choix de substrat oxydé. Nous allons voir le rôle que pourraient jouer certaines protéines découplantes dans ce cadre.

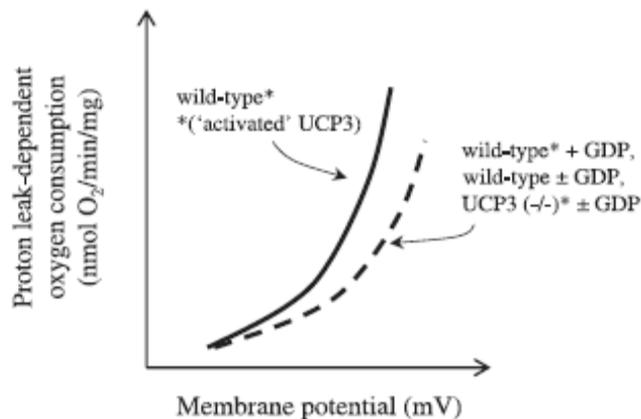
Si le potentiel de membrane peut influencer la nature du substrat oxydé, notant également que les conséquences d'un état de couplage pourront être très différentes selon le substrat disponible. Ainsi, en présence de substrats subissant une première oxydation cytosolique comme les substrats glucidiques, le potentiel de membrane mitochondrial diminuera de façon marquée mais sans emballement des oxydations, aboutissant donc à une diminution de la production d'ATP. Au contraire, lorsqu'un substrat lipidique à métabolisme exclusivement intramitochondrial est présenté, le flux mitochondrial des équivalents réducteurs n'étant pas altéré, le turnover des oxydations pourra s'accélérer, limitant ainsi la baisse du  $\Delta\Psi$  et préservant une production d'ATP au prix d'une consommation d'oxygène extrêmement élevée (Sibille, et coll., 2001).

#### ***A. Les UCPs***

Les « uncoupling proteins » (UCP) constituent une famille de plusieurs protéines appartenant à la membrane interne de la mitochondrie et dites « découplantes ». Historiquement, la première découverte fut UCP-1 exprimée dans le tissu adipeux brun et impliquée dans la thermogénèse par découplage mitochondrial. Les « nouvelles » UCPs, UCP-2 et UCP-3 sont de découverte récente puisque datant de 1997. Même s'il existe une homologie de structure assez grande (> 50%), le rôle découplant des autres UCPs est toujours sujet à caution. Nous nous focaliserons ici sur UCP-3, quasi exclusivement exprimée dans le muscle squelettique (Criscuolo, et coll., 2006, Rousset, et coll., 2004).

## 1. Potentiel de membrane : rôle découplant ou non d'UCP-3 ?

S'il existe un métabolisme mitochondrial basal diminué et une augmentation du potentiel de membrane mitochondrial chez des souris déficientes pour UCP-3, ceci ne constitue pas un indicateur formel de découplage (Bezaire, et coll., 2007).



**Figure 20** : évolution de la fuite protonique et du potentiel de membrane mitochondrial dans un modèle de souris déficiente pour UCP-3, d'après Bezaire (Bezaire, et coll., 2007).

De façon symétrique, il existe une diminution du potentiel de membrane mitochondrial chez des souris surexprimant UCP-3, qui présente une oxydation préférentielle des AG aux dépens de celle du glucose (Garcia-Martinez, et coll., 2001).

Si dans des modèles transgéniques, une modulation du potentiel de membrane mitochondrial et un effet découplant ont pu être mis en évidence, l'observation est nettement moins évidente à l'état basal ou en situation de modulation physiologique.

Néanmoins, il est assez constamment retrouvé un lien fort entre oxydation des AG et expression d'UCP-3 sans pour autant qu'existe un découplage à proprement parlé.

## 2. Rôle dans le choix de substrats

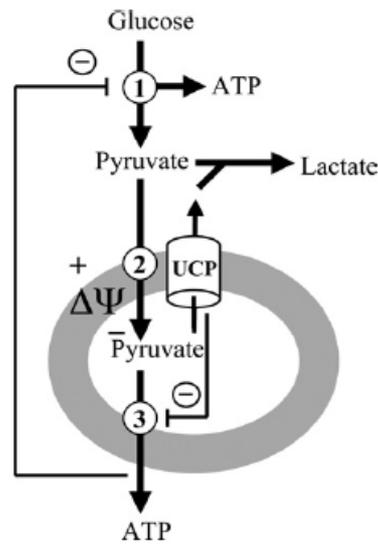
Le premier argument ayant fait évoquer un rôle possible d'UCP-3 dans l'utilisation des AG est l'ensemble des situations inductrices de ce gène. En effet, dans plusieurs situations correspondant effectivement à une utilisation accrue des AG, une élévation du messager

UCP-3 a pu être décrite. Ainsi, le jeûne, l'exposition au froid ou encore l'exercice physique s'accompagne d'une induction de la transcription d'UCP-3 (Zhou, et coll., 2000). Cependant, compte tenu de la difficulté à mettre en évidence la protéine UCP-3 dans le muscle de rongeur, la traduction protéique de cette élévation de messagers n'a que rarement pu être confirmée.

L'étude de polymorphismes chez l'homme a aussi contribué à établir ce rôle d'UCP-3, en associant des perturbations de la réponse de l'oxydation des AG dans certaines situations voire des modulations du métabolisme basal à certaines délétions ou répétitions nucléotidiques sur le gène UCP-3 (Rousset, et coll., 2004).

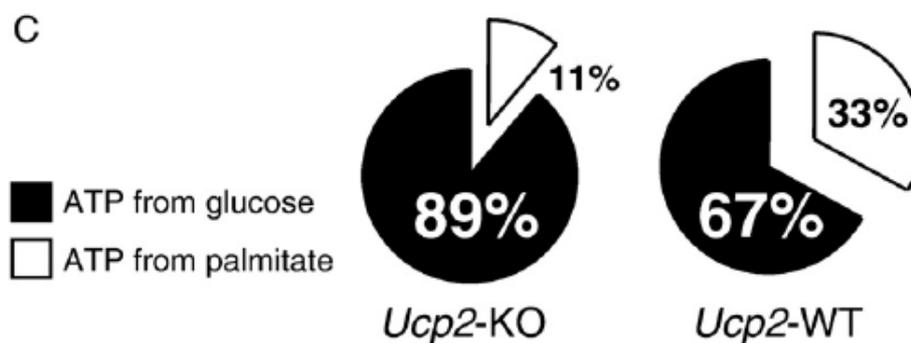
Il est alors apparu qu'UCP-3 pourrait participer à la régulation du métabolisme énergétique sans forcément exercer un rôle découplant.

Une des premières hypothèses proposées fut celle d'un rôle dans l'extrusion d'anioniques dérivés de l'action de la thioestérase sur les acyl-CoA en excès dans la matrice mitochondriale, permettant ainsi de garder cette thioestérase fonctionnelle et de maintenir un turnover de la  $\beta$ -oxydation des AG (Himms-Hagen and Harper, 2001). Des travaux ultérieurs de cette même équipe ont finalement réfuté une telle action. Aussi, UCP-3 n'interfererait pas directement dans le processus biochimique de la  $\beta$ -oxydation mais participerait plutôt à l'adaptation métabolique et à l'oxydation préférentielle des AG notamment en situation de jeûne (Seifert, et coll., 2008). Ce qui expliquerait le phénotype peu altéré des souris déficientes en UCP-3 puisqu'elles présentent une capacité d'oxydation maximale des AG normale avec simplement une impossibilité à augmenter la participation des AG à la fourniture d'énergie en situation de jeûne. L'équipe de Bouillaud a alors proposé un mécanisme réconciliant le rôle de ces nouvelles UCPs dans la facilitation du métabolisme des AG sans effet découplant (Bouillaud, 2009). Ainsi UCP-3 aurait bien une fonction de transporteur mitochondrial unipore, à rebours mais non pour les protons, ou les AG mais pour le pyruvate anionique.



**Figure 21** : rôle présumé d’UCP dans l’extrusion de pyruvate de la matrice mitochondriale, d’après Mozo (Mozo, et coll., 2006).

Ainsi, en cas de flux glycolytique dépassant les capacités oxydatives du cycle de Krebs, UCP-3 pourrait assurer le retour du pyruvate vers le cytosol, alimentant ainsi la voie de l’acide lactique et limitant le frein de la production d’ATP sur le flux glycolytique. Le rôle d’UCP-3 dans le flux glycolytique est d’ailleurs parfaitement cohérent avec le niveau d’expression décrit comme plus important dans les muscles glycolytiques (Hesselink, et coll., 2001).



**Figure 22** : rôle des nouvelles UCPs dans la balance d’oxydation AG-glucose, d’après Bouillaud (Bouillaud, 2009)

La diminution de la participation du palmitate à la fourniture d’énergie chez des souris déficientes pour UCP-2, ne serait pas liée à un effet direct de la protéine sur le transport des

AG mais bien à un effet facilitateur sur le flux de pyruvate dans la mitochondrie, limitant secondairement l'oxydation des AG. Ainsi, UCP apparaît comme un autre moyen de régulation de flux en pyruvate que la PDH, pouvant indirectement faciliter l'oxydation des AG. Le gène UCP ne serait donc pas directement répondeur aux AG, mais participerait plutôt à une stratégie visant à limiter l'oxydation du pyruvate.

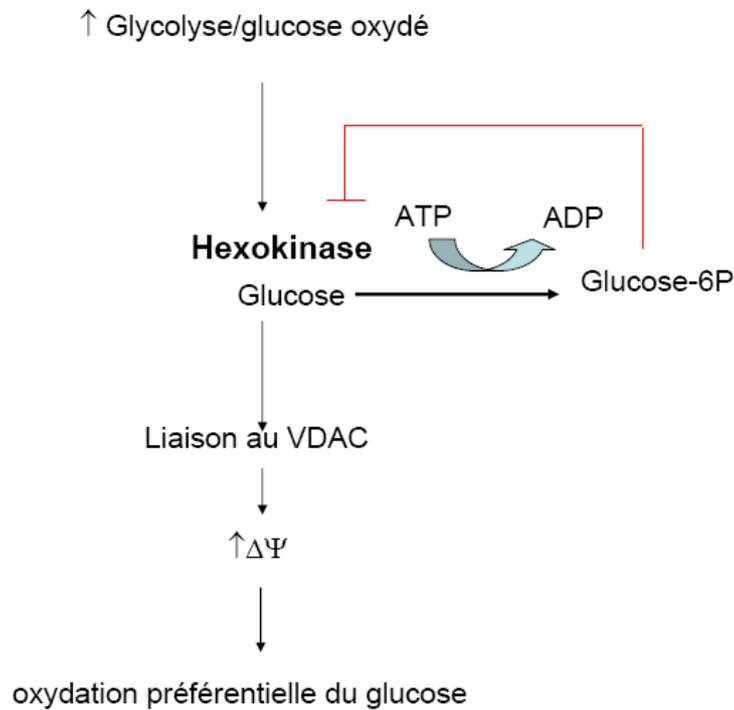
### 3. Rôle antioxydant

Cette limitation de l'oxydation du pyruvate, en limitant la production de radicaux libres, pourrait ainsi participer à l'autre rôle souvent évoqué pour les UCPs qui est celui de la lutte contre le stress oxydant. Ainsi, l'induction décrite par l'exposition aiguë à l'hypoxie (Zhou, et coll., 2000) pourrait concilier une fonction métabolique et mais aussi antioxydante.

*En résumé, le rôle joué par les UCPs sur l'orientation du choix de substrat semble pouvoir être largement dissocié de tout effet découplant ou même de toute modification du potentiel de membrane. L'hypothèse la plus actuelle, permettant de réconcilier l'ensemble des situations inductrices de l'expression d'UCP-3 et son rôle antioxydant apparaît être une fonction d'extrusion du pyruvate anionique. Alors que l'expression d'UCP-3 ne semble pas indispensable à l'oxydation des AG, l'induction d'UCP-3 pourrait être en mesure d'expliquer une augmentation de l'utilisation des AG, compensatrice d'une moindre oxydation du pyruvate.*

#### ***B. L'hexokinase et la modulation du potentiel de membrane mitochondrial***

L'hexokinase est une enzyme cytosolique qui présente la particularité de pouvoir s'associer à la membrane externe de la mitochondrie au niveau du VDAC. Cette enzyme responsable de la formation de glucose-6P est normalement inhibée par son produit. Néanmoins, lorsque celle-ci migre à la membrane mitochondriale, elle devient résistante à l'inhibition par le glucose-6P et capable de maintenir un flux glycolytique important. Cette interaction avec le VDAC modifie la perméabilité du PTP et entraîne ainsi une hyperpolarisation de la membrane (Sutendra, et coll., 2010) qui pourrait favoriser l'oxydation des équivalents réduits en provenance de glucides aux dépens de l'oxydation des AG.



**Figure 23** : rôle de la translocation de l’hexokinase dans la modulation du potentiel de membrane et de l’orientation métabolique.

Néanmoins, l’impact fonctionnel de cette modulation est encore difficile à apprécier au niveau du muscle squelettique dans lequel la captation du glucose passe majoritairement par les transporteurs Glut-4 et non pas par l’activité de l’hexokinase.

#### IV. UCP-3 et FoxO-1 : régulateurs et cibles de PPAR

Il s’agit là de revenir sur un certain nombre d’acteurs cités ci-dessus en tant que tel ou comme cibles des PPARs et de les replacer dans toute la complexité de la question. En effet, si la plupart de ces acteurs peuvent être des cibles de PPARs, ils sont partie prenante dans d’autres signalisations et leur activation transcriptionnelle n’est pas synonyme d’activation de la voie des PPARs.

##### A. UCP-3

Si UCP-3 est une cible privilégiée de PPAR-δ (Muioio, et coll., 2002, Villarroya, et coll., 2007), nous avons décliné un certain nombre de situations dans lesquelles UCP-3 était induit

sans que, pour l'instant, un lien formel ait pu être fait entre l'induction du transcrit et l'expression de PPAR. Outre le rôle des PPARs, le facteur de transcription myogénique, MyoD, a été montré comme indispensable à l'expression d'UCP-3 (Solanes, et coll., 2003, Solanes, et coll., 2000) sans que la finalité en soit claire pour l'instant.

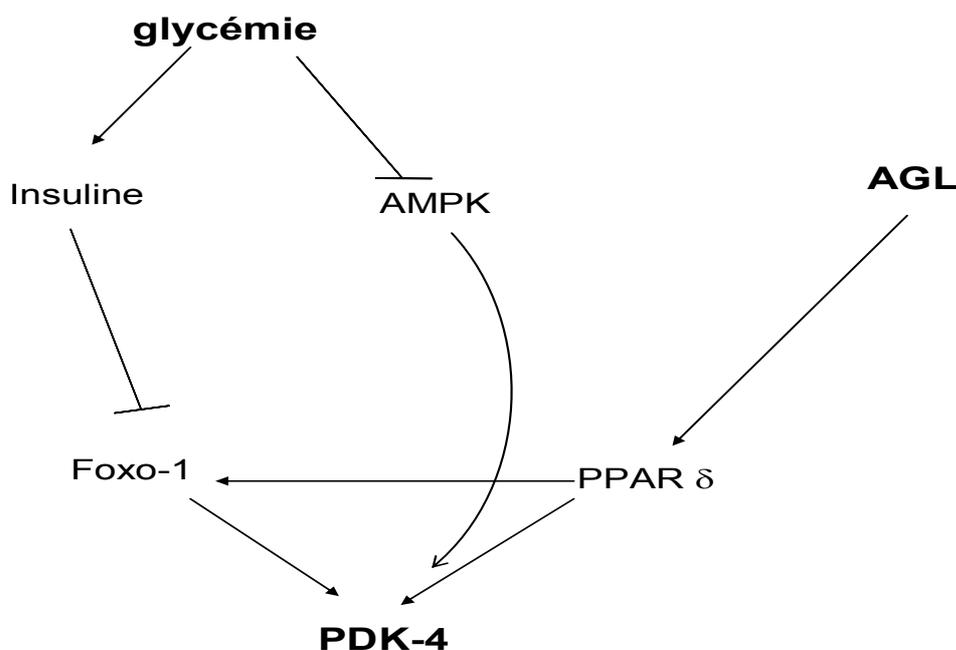
### ***B. FoxO-1***

Ainsi, comme nous l'avons vu précédemment, FoxO-1, encore appelé "forkhead transcription factor" (FKHR), est une cible de PPAR- $\delta$  nouvellement identifiée (Nahle, et coll., 2008) mais est également et avant tout régulé par la signalisation de l'insuline qui en est un puissant inhibiteur (Barthel, et coll., 2005). Ainsi, l'insuline supprime l'expression de PDK-4 indépendamment de la concentration en AGL (Lee, et coll., 2004). Or FoxO-1 est capable d'intervenir au moins à deux niveaux sur la régulation de l'utilisation des AG. Il peut non seulement induire la translocation à la membrane de Fat-CD36 et ainsi augmenter la captation d'AGL par la cellule musculaire (Bastie, et coll., 2005) mais aussi induire PDK-4 (Furuyama, et coll., 2003) qui limite l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie, favorisant par compensation l'oxydation des AG. Si PPAR- $\delta$  apparaît comme un renforçateur positif capable de d'induire une amplification du phénomène (Nahle, et coll., 2008) en réponse à une augmentation du flux d'AG, il n'est pas le seul modulateur de FoxO-1.

A travers cet exemple précis de la régulation de PDK-4, on distingue bien les interactions entre les diverses signalisations découlant des disponibilités respectives en glucides et AGL. Ainsi, un régime riche en graisse et appauvri en hydrates de carbone provoque une induction plus marquée de la transcription de PDK-4 (Chokkalingam, et coll., 2007, Peters, et coll., 2001) qu'un simple régime riche en graisse. De façon symétrique, l'ingestion de glucose limite l'expression des cibles PPARs notamment PDK-4 et UCP-3 à l'exercice (Cluberton, et coll., 2005). Si la glycémie n'influence certainement pas directement l'expression de PDK-4, elle agit indirectement par deux biais ; non seulement par la modulation de l'axe insuline-FoxO-1 mais aussi par le statut de l'AMPK. Ainsi, une glycémie élevée entraîne une réponse insulinique qui freine FoxO-1 d'une part et empêche tout activation de l'AMPK d'autre part, dont on a vu qu'elle jouait un rôle de coactivation de la transcription de PDK-4 en réponse à une élévation des AGL.

Cependant, entre la situation de jeûne (Holness, et coll., 2002) et le régime riche en graisse (Holness, et coll., 2000), on observe cependant des réponses proches sur l'activation de PDK-4 avec simplement une différence dans l'intensité des réponses et la tissu-spécificité de celle-ci : les muscles glycolytiques répondant plus au jeûne que les muscles oxydatifs alors que l'inverse est observé en cas de régime riche en graisse (Holness, et coll., 2000). Ceci évoque donc une hiérarchisation des effets, avec un rôle prédominant dévolu aux AGL dans cette régulation plus qu'à la disponibilité en glucose. Quant à la réponse différentielle liée au phénotype métabolique du muscle, elle évoque une sensibilité différente vis-à-vis des signalisations PPARs et insulinique, cohérente avec une insulinosensibilité classiquement plus grande dans les muscles oxydatifs que dans les muscles glycolytiques, alors que les agonistes PPAR ont un effet plus marqué sur ces derniers (Lunde, et coll., 2007, Luquet, et coll., 2003).

*Ceci renforce l'idée d'un effet prépondérant des AG sur l'orientation métabolique alors qu'une baisse de la disponibilité en glucose déclenche une réponse d'urgence qui s'accompagne d'une activation de l'AMPK dont on a dit plus haut qu'elle était à l'origine d'une réponse coordonnée sur ces deux voies métaboliques (Figure 24.)*



**Figure 24** : interaction entre glucose et AGL dans la régulation de l'expression de PDK-4

Cependant les interactions décrites entre ces différents acteurs moléculaires rendent encore un peu plus compliqué la détermination du rôle joué par les PPARs dans l'oxydation préférentielle de substrats. En effet, les modulations transcriptionnelles de ces cibles ne sont pas exclusives de l'action des PPARs. Il faut donc se méfier d'assimiler une induction de ces marqueurs à un rôle de causalité entre les PPARs et l'effet observé.

## **V. Inter-relations moléculaires et régulation du métabolisme énergétique**

Après avoir présenté ces différents acteurs, métaboliques, hormonaux et transcriptionnels, nous allons illustrer leur hiérarchisation à travers deux situations physiologiques au cours desquelles une balance acides gras - glucose est communément observée.

### ***A. Au cours du jeûne***

L'observation d'une baisse du quotient respiratoire au cours du jeûne est classique et traduit une propension à utiliser de façon préférentielle les AG. Une telle adaptation métabolique systémique est également retrouvée au cours d'un régime riche en graisse mais pauvre en hydrates de carbone (Peters, et coll., 2001).

Une des premières observations en situation de jeûne est la diminution de la glycémie. Celle-ci aboutit rapidement à une augmentation rapide de l'AMP cytosolique et à l'activation quasi immédiate de l'AMPK qui va inactiver l'ACC et faire diminuer précocement le contenu en malonyl-CoA qui facilite le transport des AGLC dans la mitochondrie.

De plus, cette baisse de la glycémie s'accompagne d'une baisse conjointe de l'insulinémie dont on a vu qu'elle était un puissant répresseur de FoxO-1. Elle permet aussi de libérer la lipolyse et permet ainsi la mobilisation des réserves lipidiques du tissu adipeux blanc. Cette lipolyse est aussi favorisée par l'élévation des glucocorticoïdes, hormones lipolytiques. L'ensemble de ces modulations hormonales aboutit à une augmentation de la disponibilité en AGL. Le tableau est donc celui d'une glycémie basse avec une élévation des AGL plasmatiques.

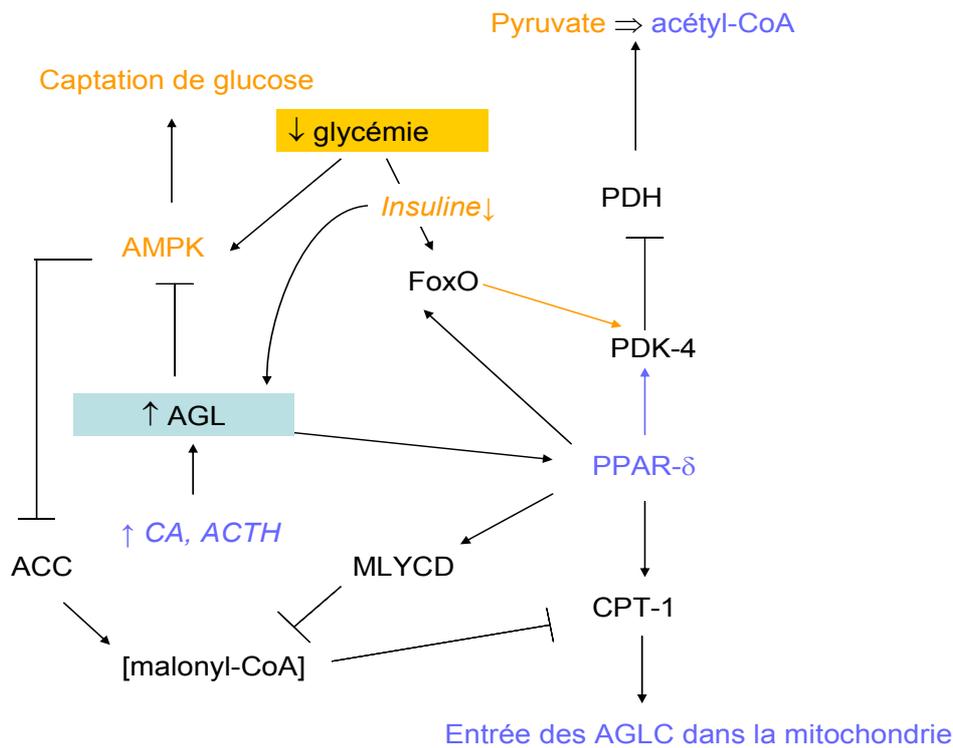
Deux voies transcriptionnelles vont donc rentrer en jeu : d'une part la libération de la voie FoxO-1 du fait de la baisse d'insulinémie, et d'autre part l'activation de PPAR- $\delta$  précoce et fugace (de Lange, et coll., 2006, de Lange, et coll., 2004). La première cible commune à ces deux voies est PDK-4 dont l'activation transcriptionnelle est retrouvée (Peters, et coll., 2001,

Wu, et coll., 2001) aboutissant à l'inhibition de la PDH (Wu, et coll., 2001). Ainsi au cours de jeûne, l'oxydation du pyruvate est diminuée par un frein à son entrée mitochondriale.

Les autres cibles spécifiques de la voie des PPARs à être induites sont CPT-1 et la thioestérase qui vont respectivement favoriser l'entrée des AGL et leur oxydation mitochondriale.

Cette facilitation associée au frein sur le flux en pyruvate va favoriser l'oxydation préférentielle des AG aux dépens des glucides.

Quant à l'AMPK, son activation précoce et son mode d'action par phosphorylation ont permis la libération précoce du frein au transport des AGLC tout en facilitant aussi la captation des glucides. Dans une première phase, on assiste donc à une production d'énergie tous azimuts et assez peu sélective d'un substrat le temps que les activations transcriptionnelles se mettent en place. A partir du moment où elles sont effectives, l'augmentation des capacités à oxyder les AG permet la mise en place d'une épargne glucosée, et ce probablement même si l'activation de l'AMPK est encore sensible. Cependant, lorsque la phase de jeûne se prolonge, il a bien été décrit une inactivation progressive de l'AMPK, probablement sous l'effet de l'augmentation des AGL mais sans qu'un mécanisme précis ait pu être proposé pour l'instant (de Lange, et coll., 2006, de Lange, et coll., 2007). Ainsi, l'activation de l'AMPK cessant, la captation du glucose n'est plus soutenue, laissant le champ libre à l'oxydation des AGL.



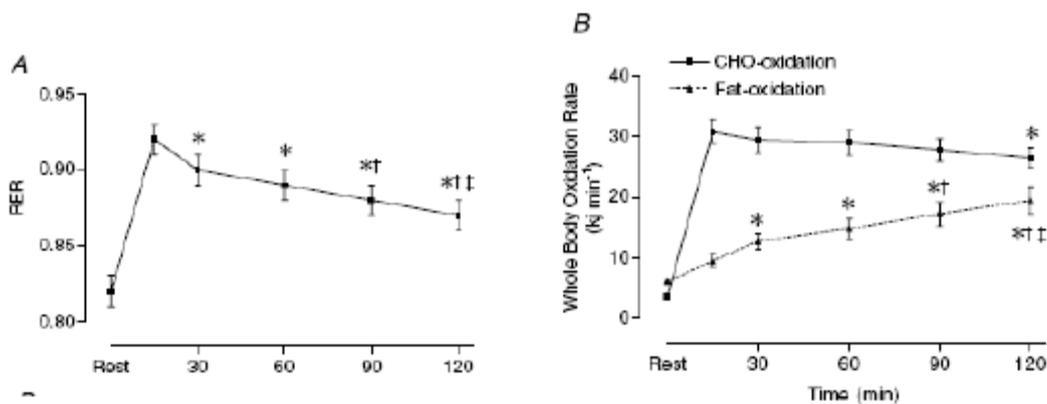
**Figure 25 :** réponse au jeûne

Outre les cibles citées ci-dessus, la voie des PPARs induit également UCP-3 en réponse au jeûne. Pourtant, De Lange ne retrouve pas pour autant de modification de la conductance protonique notée à 12, 24 ou 48 h. (de Lange, et coll., 2006). Pourtant, à moyen terme (2 semaines à 2 mois) d'une restriction calorique (40% de réduction des apports caloriques), Bevilacqua retrouve une diminution de la consommation d'oxygène, associée à une baisse de la force protomotrice (Bevilacqua, et coll., 2004) qui se normalise au-delà de 6 mois. Quelle que soit la raison à cette diminution de la force protomotrice à moyen terme d'une restriction calorique, liée ou indépendante de l'induction d'UCP-3, elle pourrait participer à une orientation vers une préférence pour les substrats lipidiques.

### B. Au cours d'un exercice aigu

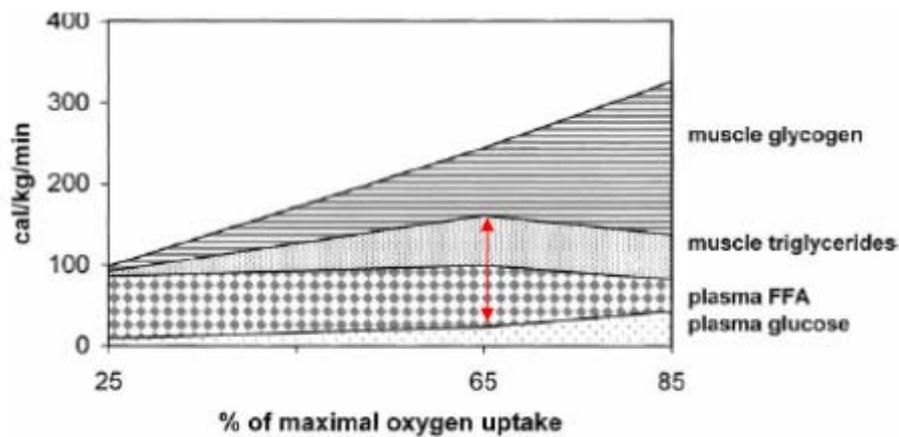
C'est certainement au cours de l'exercice physique que l'adaptation métabolique concernant la nature du substrat oxydé a été la mieux étudiée. Ainsi depuis bientôt 20 ans, la dépendance au glucose au fur et à mesure que l'intensité de l'exercice augmente a été établie alors que les AG sont essentiellement utilisés aux faibles intensités d'exercice (Brooks and Mercier, 1994, Romijn, et coll., 1993). Il faut dès lors noter que plus que l'intensité ou la puissance absolue de l'exercice, c'est leur expression relative aux capacités aérobie maximales qui importe. Ainsi, on définira pour chaque sujet une intensité et/ou une puissance relative; un exercice étant considéré comme sous maximal pour une puissance de réalisation inférieure à 65% des capacités aérobies maximales développées par le sujet.

#### 1. Intensité et durée d'exercice



**Figure 26** : évolution du quotient respiratoire et de la participation des substrats lipidiques et glucidiques à la fourniture d'énergie au cours d'un exercice sous maximal, d'après Holloway (Barnholt, et coll., 2006)

On peut observer que lorsqu'un exercice d'intensité modérée (60% de la  $VO_{2max}$ ) se prolonge, le quotient respiratoire s'abaisse, s'accompagnant après 2 heures d'exercice, d'une augmentation constante de la participation des lipides à la fourniture d'énergie.



**Figure 27** : représentation de la contribution calorifique maximale des différents substrats en fonction de l'intensité relative de l'exercice, d'après Romijn (Romijn, et coll., 2000).

On peut observer que lorsque l'intensité de l'exercice augmente de 25 à 65% de la VO<sub>2</sub>max, la quantité absolue d'énergie fournie par les substrats lipidiques augmente, pour ensuite diminuer progressivement.

Ceci suggère en fait deux questions :

- 1) Comment l'oxydation des AG augmente-t-elle aux faibles intensités d'exercice ?
- 2) Pourquoi, passée une intensité de 65% des capacités maximales oxydatives, l'oxydation des AG s'effondre-t-elle ?

A l'exercice d'intensité inférieure à 60% existe une augmentation de l'oxydation des AG et du glucose en relation avec l'activation de l'AMPK. Pour Sahlin, dans ce cas de figure, l'utilisation relative des glucides et des lipides est en large partie déterminée par la disponibilité en substrat (Sahlin, 2009).

Par un design expérimental raffiné, Coyle a pu montrer que le niveau d'oxydation en palmitate au cours d'un exercice de faible intensité (50% de la VO<sub>2</sub>max) était limité par une charge glucosée alors que celle-ci restait sans effet sur le niveau d'oxydation en octanoate. Alors que l'oxydation en octanoate est indépendante de la glycémie et évolue de façon directement proportionnelle à l'intensité relative de l'exercice et à la dépense énergétique, l'oxydation du palmitate n'est pas seulement dictée par l'intensité de l'exercice mais aussi par la disponibilité en glucose (Coyle, et coll., 1997). On retrouve ici l'application de la théorie de

Mac Garry ( Mc Garry, 1998) où la disponibilité en glucose est capable d'influencer le niveau d'oxydation des AGLC (Wolfe, 1998). L'évolution de la nature du substrat oxydé lorsque l'exercice se prolonge, observée sur la figure 25, est un autre argument en faveur de cette théorie ; alors que l'épuisement des stocks en glycogène survient, s'installe alors en parallèle de la dépendance au glucose circulant (qu'il provienne d'apport exogène ou de la néoglucogenèse hépatique), un entretien de la mobilisation et du niveau d'utilisation des AGL au cours d'un exercice prolongé de faible intensité.

***L'AMPK pourrait en grande partie rendre compte de ce qu'on observe aux faibles intensités d'exercice, avec notamment l'augmentation progressive de l'utilisation des AG via la suppression de l'activité de l'ACC, qui fait diminuer les concentrations de malonyl-CoA et libère ainsi l'activité CPT-1 et le transport mitochondrial des AGL.***

Par contre, ceci ne peut en aucun cas expliquer ce que l'on observe aux puissances élevées, alors que la concentration d'AMPK ne cesse d'augmenter avec la puissance de l'exercice.

A l'exercice d'intensité supérieure à 70%, on observe que la part d'oxydation relative mais aussi absolue dédiée à l'oxydation des acides gras diminue alors que le niveau d'activité de l'AMPK ne fait que croître et devrait inhiber quasiment complètement l'ACC et effondrer les taux cytosoliques de malonyl-CoA. En effet, il a été montré que l'activité de l'AMPK était directement reliée à la puissance absolue de l'exercice (Wadley, et coll., 2006). Avec le même type de technique que ci-dessus, utilisant un AGCC et un AGCL marqués, il a pu être mis en évidence que le frein à l'oxydation des AG avec l'augmentation de la puissance d'exercice, portait essentiellement sur l'étape de transport des AGLC (Sidossis, et coll., 1997). Or, les concentrations en malonyl-CoA varient pourtant peu pour des exercices allant de 60 à 100% de la  $VO_2max$ , et ce alors même que l'activité de l'ACC diminue (Dean, et coll., 2000).

***A haute puissance d'exercice, ce n'est donc pas la disponibilité plasmatique, ni même cytosolique en AGL, qui est le facteur limitant de leur utilisation mais bien la capacité de transport mitochondrial de ceux-ci. De plus, la concentration en malonyl-CoA n'en semble pas l'élément déterminant. Plus généralement, ce cas particulier illustre bien le fait qu'un facteur de régulation tel que l'est le malonyl-CoA vis-à-vis de l'activité CPT-1 n'est pas forcément le facteur limitant de ce transport.***

Sahlin propose trois hypothèses pour expliquer le paradoxe d'une limitation au transport des AGLC alors pourtant que l'AMPK est activée. La première est l'inhibition de l'activité CPT-1 par l'acidose issue de la production de lactate à haute intensité. La deuxième réside dans l'accumulation d'acétyl-CoA qui se combine alors avec la carnitine qui n'est plus disponible pour le transport CPT. Enfin la troisième réside dans l'accumulation de NADH qui est un puissant inhibiteur de la  $\beta$ -oxydation, notamment en maintenant un potentiel de membrane élevé défavorable à l'oxydation des AG (Sahlin, 2009).

## 2. Cibles à l'exercice

Comme pour la réponse au jeûne, l'exercice s'accompagne d'une baisse de l'insulinémie et d'une augmentation de la disponibilité en AGL, respectivement impliqués dans les modulations d'activité de l'AMPK ou des PPARs.

### 2.1 Quel rôle pour l'augmentation des AGL et la stimulation de la voie des PPARs

Pour identifier le rôle de l'élévation des AGL par rapport aux autres stimuli présents à l'exercice, plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour limiter l'élévation des AGL. Par exemple, en bloquant la lipolyse d'exercice par un agent pharmacologique comme l'acide nicotinique, il persiste une activité PDH plus élevée que lorsqu'il existe une élévation des AGL (Stellingwerff, et coll., 2003). *A contrario*, un régime riche en graisse précédant l'exercice effondre l'activité PDH (Odland, et coll., 2000). Par ailleurs, une stratégie nutritionnelle avec un régime riche en hydrates de carbone, diminue l'intensité et la durée de la réponse transcriptionnelle, notamment celle de PDK-4 en période de récupération (Pilegaard, et coll., 2005). Parmi l'ensemble des cibles PPARs, ce gène semble présenter d'ailleurs une sensibilité particulière aux AGL, bien supérieure à celle de Fat CD36, CPT-1b ou même UCP-3 (Tunstall and Cameron-Smith, 2005).

Cependant, la diminution de l'activité PDH observée au cours d'un exercice prolongé à intensité modérée, en cohérence avec l'augmentation de l'expression transcriptionnelle des pyruvate déshydrogénases kinases. Cependant, celle-ci ne s'accompagne pas de modification de leur expression protéique, portant à croire que la modulation de l'activité de la PDH est

plus d'origine allostérique que médiée par l'état de phosphorylation de la protéine (Watt, et coll., 2004). Même si Russel a pu montrer qu'une induction de PPAR- $\delta$  persistait à distance de l'arrêt de l'exercice, y compris en l'absence d'élévation des AGL (Russell, et coll., 2005), cet effet semble trop retardé pour avoir un réel impact transcriptionnel au cours d'un exercice unique.

## 2.2 Variation de la [malonyl-CoA]

Si la diminution du contenu en malonyl-CoA est bien établie chez le rongeur, les études chez l'homme sont encore partagées ne retrouvant qu'inconstamment cette baisse. Il est probable que les délais liés à la biopsie musculaire soient trop importants pour enregistrer de façon fiable une évolution de la concentration d'un métabolite très labile. Ainsi, une diminution des concentrations en malonyl-CoA au cours de l'exercice est admise (Odland, et coll., 2000) même si celle-ci n'a pas toujours été retrouvée dans toutes les études, en particulier chez l'homme.

### a) Rôle de l'AMPK

Comme nous l'avons dit auparavant, l'AMPK, activée à l'exercice par au moins 2 voies distinctes - celle de l'AMP et celle du calcium – pourrait participer à la baisse du contenu en malonyl-CoA. Néanmoins, à l'exercice, la modulation de l'ACC ne dépend pas que de l'activation de l'AMPK. En effet même dans un modèle de souris déficiente pour LKB-1 et ne possédant donc pas de signalisation AMPK, la contraction musculaire induite par stimulation électrique est capable d'inactiver l'ACC (Thomson, et coll., 2007). Pour conforter cette hypothèse, chez des souris déficientes pour AMPK- $\alpha 2$ , il a récemment été montré *in vitro* et *ex vivo* que la contraction musculaire était capable d'inhiber l'ACC et d'abaisser la concentration de malonyl-CoA cellulaire sans donc nécessité de la signalisation AMPK (Dzamko, et coll., 2008). Si ceci n'exclut cependant pas que l'activation de l'AMPK, bien réelle à l'exercice, participe à la modulation du métabolisme des AG, cela doit faire envisager les autres facteurs de régulations possibles sans rester uniquement focalisé sur les variations de l'AMPK, et ce d'autant qu'il n'est pas retrouvé de corrélation entre les concentrations de malonyl-CoA à l'exercice et l'activité de l'AMPK. Ainsi, deux exercices réalisés à même puissance relative, l'un avec déplétion glycogénique préalable et l'autre sans, présentent des concentrations comparables en malonyl-CoA, alors pourtant que les niveaux d'activation d'AMPK sont très différents dans un cas et dans l'autre (Roepstorff, et coll., 2005).

#### b) Les autres régulateurs

Comme nous l'avons vu précédemment (Figure 16), la concentration en malonyl-CoA est régulée par 2 enzymes clé : l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et la MCD (malonyl-CoA déshydrogénase). Ainsi l'induction de la MCD pourrait jouer un rôle complémentaire. Cependant, la phosphorylation de la MCD par l'AMPK reste tout à fait hypothétique et sa cinétique de régulation transcriptionnelle par les PPARs rend peu probable une intervention à court terme. Par contre, ce facteur pourrait jouer un rôle majeur en période de récupération pour maintenir une oxydation des AG afin de restaurer le stock en glycogène alors que l'activation de l'AMPK a cessé dès l'arrêt de l'exercice.

### 2.3 Fonctionnalité CPT1 et résistance au malonyl-CoA

#### a) Activité CPT-1

Indépendamment des variations de concentration en malonyl-CoA, il n'a pas été retrouvé de variation ni de l'activité maximale de CPT-1, ni de sa cinétique à concentration croissante de PCoA dans le muscle vaste externe au cours d'un exercice de 120 minutes à 60% de  $VO_2\text{max}$  chez l'homme (Holloway, et coll., 2006).

#### b) Sensibilité au malonyl-CoA

Par contre, le pouvoir inhibiteur du malonyl-CoA sur l'activité CPT-1 diminue de façon progressive au fur et à mesure que se prolonge un exercice d'intensité modérée (Barnholt, et coll., 2006).

### 2.4 Translocation de Fat CD36 à la membrane mitochondriale

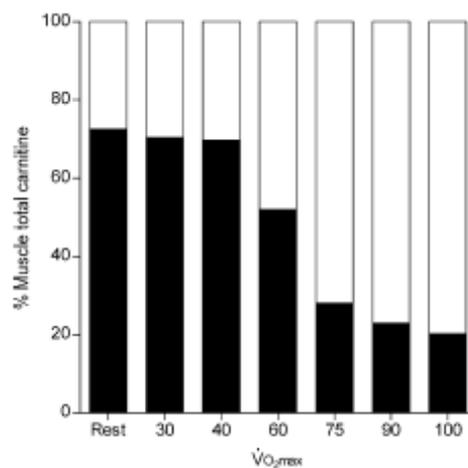
Lors d'une contraction par électrostimulation *ex vivo*, il existe une coimmunoprécipitation entre CPT-1 et Fat CD36 (Bonen, et coll., 2004). Cette translocation du pool cytosolique vers la membrane mitochondriale a été retrouvée *in vivo* au cours de l'exercice (Holloway, et coll., 2006)

### 2.5 La concentration en carnitine libre

Pour étayer l'hypothèse de Sahlin concernant un éventuel déficit en carnitine impliqué dans la limitation du transport carnitine translocase, il a effectivement été retrouvé une chute brutale du contenu musculaire en carnitine libre pour une puissance d'exercice supérieure à 60% de la  $VO_2\text{max}$  (Stephens, et coll., 2007). Roepstorff, en jouant non pas sur l'intensité de l'exercice

mais sur le statut glycogénique préalable à l'exercice, retrouve le même résultat avec une déplétion accrue en carnitine dans le groupe ayant reçu une charge élevée en hydrates de carbone. Ce groupe présente une diminution nette de l'oxydation des AG à l'exercice alors que ses concentrations en malonyl-CoA sont comparables avec l'autre groupe. La forte activité de la PDH retrouvée laisse à penser que le flux en acétyl-CoA mitochondrial a pu dépasser les capacités du cycle de Krebs et favoriser la constitution de complexes d'acétylcarnitine (Roepstorff, et coll., 2005).

*Ainsi, la levée du frein sur l'activité de la PDH à l'exercice pourrait non seulement maintenir un niveau élevé d'oxydation du pyruvate, mais aussi participer à l'altération du transport des AGLC par déplétion en carnitine libre.*



**Figure 28** : évolution de la fraction libre (barre noire) et de la fraction liée sous forme d'acétylcarnitine (barre blanche) dans le vaste externe, 4 minutes après un exercice d'intensité variable, d'après Stephens (Stephens, et coll., 2007).

## 2.6 UCP-3

Enfin, une induction d'UCP-3 au cours de l'exercice a été décrite (Zhou, et coll., 2000) qui pourrait, outre sa participation métabolique, s'intégrer dans une stratégie de lutte contre les espèces réactives de l'oxygène produites par l'augmentation de la consommation d'oxygène (Jiang, et coll., 2009).

*Enfin, à faible intensité d'exercice, l'augmentation relative de l'oxydation des AG aux dépens du pyruvate semble impliquer à la fois une diminution de l'activité de la PDH essentiellement par régulation allostérique, associée à une baisse des concentrations en malonyl-CoA sous l'effet d'une activation de l'AMPK. La diminution de sensibilité au malonyl-CoA et la translocation de Fat CD36 à la membrane mitochondriale pourraient également participer à la facilitation du transport CPT. Le rôle de la signalisation PPAR semble ici relativement faible au décours d'un exercice unique mais pourrait intervenir dans les processus de récupération métabolique ou encore lors de répétitions d'exercice. A plus haute intensité, le frein à l'oxydation des AG serait localisé certainement au niveau du transport mitochondrial des AGLC et pourrait impliquer un déficit en carnitine libre qui deviendrait limitant, échappant alors à la régulation habituelle par le malonyl-CoA.*

## **Chapitre III. Modification de l'utilisation des substrats par les muscles squelettiques au cours de l'entraînement en endurance et de l'exposition à l'hypoxie**

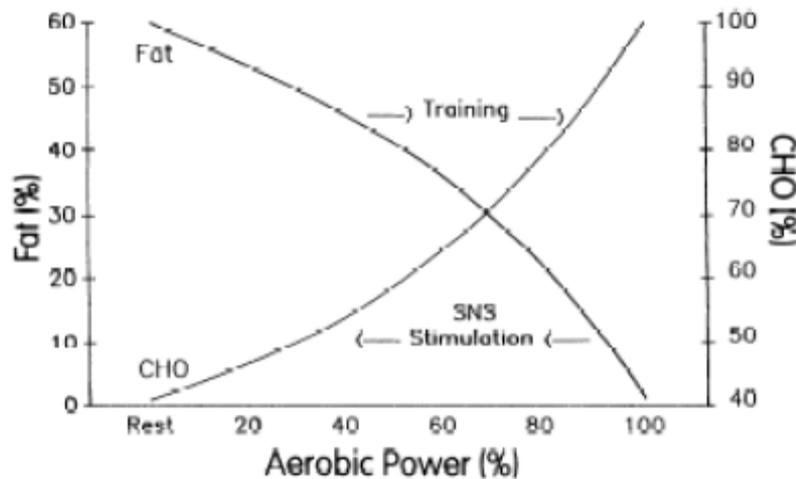
Nous allons maintenant décrire deux situations, l'une physiologique, l'autre environnementale en nous centrant, uniquement sur les changements de préférence métabolique qu'ils engendrent. L'entraînement d'une part et l'exposition à l'hypoxie chronique d'autre part induisent un certain nombre d'adaptations issues de perturbations aiguës qui génèrent dans les deux cas un véritable challenge métabolique. En situation aiguë d'exercice, il s'agit d'une augmentation considérable des besoins énergétiques liés à la contraction musculaire ; lors de l'exposition aiguë à l'hypoxie, c'est la baisse en oxygène tissulaire qui peut rendre difficile la fourniture d'énergie par les filières aérobies. Lorsque les perturbations se prolongent ou se répètent, l'organisme développe des adaptations comportementales, des adaptations systémiques cardio-respiratoires et vasculaires sur lesquelles nous ne reviendrons pas. Concernant le métabolisme musculaire, des adaptations tissulaires se mettent en place. Alors qu'en situation aiguë, seules des régulations enzymatiques allostériques ou par phosphorylation/déphosphorylation sont susceptibles d'intervenir, à moyen terme d'autres adaptations peuvent se mettre en place. Outre le développement d'un réseau vasculaire, le réseau mitochondrial est capable d'être modulé. La première adaptation possible est d'ordre quantitatif mais des adaptations mitochondriales qualitatives peuvent aussi se mettre en place avec des modifications intrinsèques.

### **I. L'entraînement en endurance**

#### ***A. Glissement vers des puissances plus élevées du point de croisement glucido-lipidique***

Nous avons vu ci-dessus l'évolution de l'utilisation de substrat à l'exercice aigu en fonction de la puissance de ce dernier. L'augmentation relative de la part d'énergie fournie par les glucides, conjointement à la diminution de celle fournie par les lipides au fur et à mesure de

l'augmentation de la puissance relative d'exercice a pu être modélisée par Brooks et Mercier en 1994 par le concept de « cross over » (Brooks and Mercier, 1994), défini en français comme le point de croisement glucidolipidique (Figure 29)



**Figure 29** : concept de « point de croisement glucido-lipidique »

Il correspond à la puissance d'exercice à partir de laquelle existe un infléchissement drastique de la part d'énergie fournie par les lipides et une augmentation exponentielle de celle fournie par les glucides. Sur ce modèle, les effets de l'entraînement aérobique ont pu être schématisés par une translation vers la droite de point de croisement c'est-à-dire un décalage vers des puissances d'exercices plus élevées. Ceci représente l'augmentation des capacités à oxyder les AG sous l'effet de l'entraînement non seulement en valeur absolue mais aussi en valeur relative, ce qui se traduit par une participation des lipides plus importante à la fourniture d'énergie à une intensité relative d'exercice donnée. Il faut néanmoins noter, que les aspects exponentiels des courbes perdurent à l'entraînement et qu'il persiste donc le même profil d'évolution de la consommation en substrats glucido-lipidique avec l'augmentation de la puissance d'exercice.

Cette adaptation métabolique a pu être mise en corrélation avec la performance aérobique sous-maximale. En effet, on comprend bien, que plus on devient dépendant du glucose pour de s intensités d'exercice, plus l'on va consommer rapidement ses réserves en glycogène musculaire puis hépatique. Une fois épuisés, la seule source de glucose provient de la

néoglucogénèse hépatique ou d'apports exogènes. Le bénéfice à déplacer cette dépendance aux glucides vers des intensités plus élevées réside dans l'économie de glycogène ainsi réalisée.

La première explication donnée à cette augmentation de la consommation en AG est celle d'une augmentation de la population mitochondriale avec l'entraînement.

### ***B. Adaptation quantitative et aspécifique***

Indépendamment de la nature du substrat oxydé, l'entraînement aboutit à une augmentation des capacités oxydatives globales (Holloszy, et coll., 1970)

#### **1. Biogénèse mitochondriale**

Celle-ci est possible grâce à l'augmentation par l'entraînement de l'activité d'un cofacteur transcriptionnel qui régule la biogénèse mitochondriale : PGC-1 $\alpha$  et se traduit à terme par une augmentation du réseau mitochondrial.

#### **2. Enzymes du cycle de Krebs et PDH**

Après un entraînement aérobie, on observe une nette augmentation des activités des enzymes du cycle de Krebs, notamment celle de la citrate synthase. Selon les études, son activité augmente entre 45 et 72% dans le plantaris ou le soléaire de rat entraîné pendant 8-12 semaines (Horowitz, et coll., 2000, Zoll, et coll., 2003). D'autres enzymes, tels que l' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase, la succinate déshydrogénase (SDH) ou encore la malate déshydrogénase (MDH) ont une activité généralement augmentée de 50 à 200% chez les sujets entraînés comparativement aux sédentaires (Kayser, et coll., 1996, Schantz, et coll., 1986). Cette adaptation concerne le turnover de l'acétyl-coA, quelque soit l'origine glucidique ou lipidique de ce dernier.

Seule une modulation de l'activité de la PDH est en mesure de contrôler le flux de pyruvate et l'origine de l'acétyl-coA. Même s'il a été montré une augmentation de 30% de l'activité de la PDH après 8 semaines d'entraînement, l'augmentation de cette enzyme mitochondriale doit être mise en relation avec l'augmentation de la population mitochondriale à l'entraînement. Par contre, l'augmentation de 100% l'activité PDKinase ne peut pas simplement être expliquée par cette augmentation de la quantité de mitochondries (LeBlanc, et coll., 2004)

***Après adaptation à l'entraînement, l'augmentation de la PDH permet au flux de pyruvate de suivre l'augmentation des capacités oxydatives mais en comparaison les enzymes limitant l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie augmentent de façon plus importante.***

### 3. Enzymes de la chaîne respiratoire

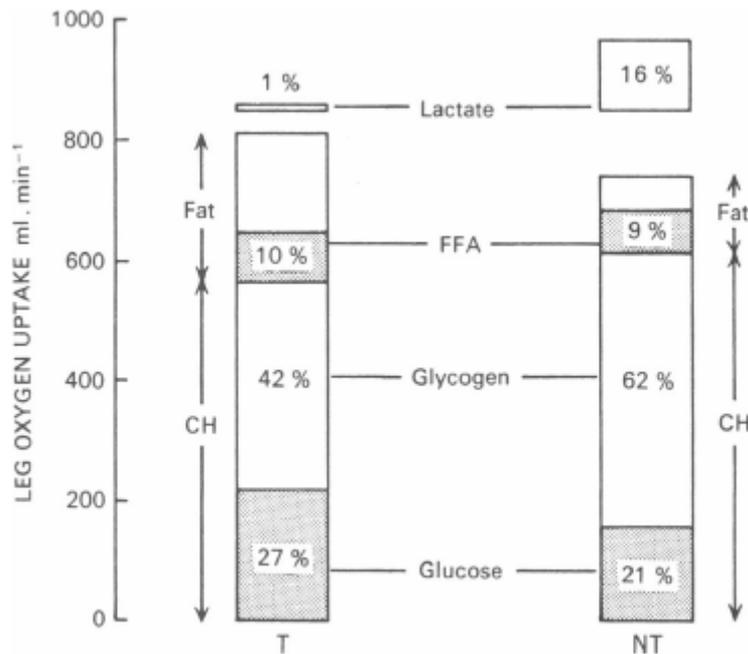
Suite à un entraînement aérobie, les enzymes clés de la chaîne mitochondriale ont une activité accrue. C'est le cas pour la cytochrome oxydase (le complexe IV de la chaîne respiratoire), utilisée comme marqueur mitochondriale de la capacité oxydative et dont l'activité augmente entre 34 et 70% selon les études (Burelle and Hochachka, 2002, Robinson, et coll., 1994).

Quelque soient les adaptations citées ci-dessus, elles concernent les étapes mitochondriales communes à l'oxydation de tout substrat.

#### ***C. Adaptations spécifiques de l'oxydation des AG***

C'est Molé qui a décrit initialement les adaptations du métabolisme lipidique en réponse à l'entraînement (Mole, et coll., 1971). Ainsi, sur muscle entier, il montre l'augmentation des capacités oxydatives pour les AG. Cependant celle-ci est en rapport avec l'augmentation de la densité mitochondriale. Les enzymes de la  $\beta$ -oxydation comme la 3-HAD, du transport mitochondrial des AG étant augmenté de façon comparable aux augmentations des enzymes du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire.

Cependant, une étude utilisant une technique de différence artério-veineuse et des substrats marqués retrouve que la quantité d'énergie fournie par des lipides pour un exercice réalisé à intensité absolue constante, augmente à l'issue d'une période d'entraînement aérobie. (Henriksson, 1977)



**Figure 30** : évolution de la proportion d'énergie fournie par les différents substrats au cours d'un exercice à puissance absolue constante avant (NT) et après entraînement (T), d'après Henriksson (Henriksson, 1977)

Néanmoins, cette observation pourrait simplement être liée à une diminution de la puissance relative de l'exercice compte tenu de l'amélioration de la  $VO_{2max}$  à l'entraînement.

Pourtant, Coggan précise ultérieurement qu'il ne s'agit pas simplement d'une augmentation de la quantité d'énergie fournie par les AG en rapport avec une augmentation des capacités oxydatives globales. En effet, même en prenant en compte le gain de  $VO_{2max}$ , les lipides fournissent une part d'énergie plus importante qu'avant entraînement et à puissance relative comparable (Coggan, et coll., 2000)

## 1. Augmentation du transport des acides gras

### 1.1 Augmentation du transport sarcolemmal des AG

Même si les capacités intramitochondriales d'oxydation phosphorylante sont accrues, l'utilisation des AG est conditionnée, dans un premier temps, par leur disponibilité cytosolique. Même si nous avons dit auparavant, que celle-ci n'était pas limitante, il faut tout de même qu'elle s'adapte au nouveau dimensionnement du réseau mitochondrial. Dès 1999, Bonen, montre qu'une contraction induite par stimulation électrique chronique augmente

l'expression en messagers et protéines de Fat CD36 se traduisant par une augmentation de la captation des AG par la cellule musculaire (Bonen, et coll., 1999). Cette augmentation du pool cytosolique de Fat CD 36 est retrouvée à l'entraînement (Talanian, et coll., 2010, Tunstall, et coll., 2002).

Outre cette augmentation du transport sarcolemmal, Tunstall montre aussi une augmentation de la transcription de CPT-1b (Tunstall, et coll., 2002).

### 1.2 Augmentation de l'activité CPT-1

Pour Sidossis, les adaptations liées à l'entraînement porteraient essentiellement sur les capacités de transport mitochondrial des AGLC puisqu'il retrouve des capacités augmentées pour l'oxydation de l'oléate mais pas de l'octanoate (Sidossis, et coll., 1998). L'absence d'amélioration des capacités oxydatives en octanoate est tout de même interpellant dans cette étude d'autant que celle-ci avait été retrouvée à plusieurs reprises depuis les travaux de Molé en 1971.

La mesure d'une activité enzymatique CPT-1 augmentée à l'entraînement est retrouvée par plusieurs auteurs (Berthon, et coll., 1998, Jong-Yeon, et coll., 2002). Cependant la corrélation entre les activités CS et CPT-1 après entraînement évoque une augmentation en fait proportionnelle à l'augmentation du contenu mitochondrial (Berthon, et coll., 1998). Plus tard, Koves par des mesures sur muscle entier et sur fraction mitochondriale, montre que le paramètre essentiellement modulé ici est en fait la quantité de mitochondries présente par poids de tissu frais (Koves, et coll., 2005).

Par ailleurs, les concentrations en malonyl-CoA présentes à l'exercice, diminuent après entraînement. Cette baisse du malonyl-CoA s'accompagne d'une augmentation des messagers MCD et de l'activité de cette enzyme alors que l'activité de l'AMPK n'est pas modifiée (Kuhl, et coll., 2006).

Ceci évoque un rôle prépondérant de la voie PPAR sur celle de l'AMPK dans le développement des adaptations de la fonctionnalité CPT-1 à l'entraînement.

### 1.3 Majoration de la fraction mitochondriale de Fat CD36

Enfin, un programme d'entraînement de douze semaines, conduit chez l'obèse en association à un régime hypocalorique a permis d'augmenter la fraction mitochondriale du transporteur Fat CD36 (Schenk and Horowitz, 2006). Récemment, Talanian a confirmé la redistribution du

pool de Fat CD36 à la membrane mitochondrial après six semaines d'entraînement conduites chez l'homme sain (Talanian, et coll., 2010).

## 2. Augmentation des enzymes de la $\beta$ -oxydation

Depuis les premiers de travaux de Molé et coll., de nombreuses études ont retrouvé une augmentation de l'activité des enzymes de la  $\beta$ -oxydation: acyl-CoA déshydrogénases, 3-HAD, ou thioestérase (Baldwin and Haddad, 2002, Horowitz, et coll., 2000, Mole, et coll., 1971).

***L'ensemble de ces observations tend à expliquer comment l'oxydation maximale des AG peut-être accrue après entraînement. Cependant, elles ne sont que peu convaincantes pour expliquer le ralentissement dans la dégradation du niveau d'utilisation des lipides par rapport à l'utilisation des glucides. Il faut certainement chercher des adaptations d'ordre plus qualitatif pour pouvoir l'expliquer.***

## 3. Augmentation d'efficacité du système des créatine-kinases mitochondriales

Suite à un entraînement en endurance, les mitochondries présentent une plus faible sensibilité à l'ADP mais une plus grande sensibilité à la créatine (Burelle and Hochachka, 2002, Zoll, et coll., 2003). Zoll en 2002 (Zoll, et coll., 2002), montre que l'affinité pour l'ADP chez l'athlète entraîné est multipliée par trois en présence de créatine. Ainsi, la régulation de la respiration par l'isoforme mitochondriale de créatine kinase (mi-CK) devient prépondérante avec l'entraînement, ce qui implique un meilleur couplage entre les sites de production et d'utilisation de l'ATP.

Cette adaptation est représentative d'une transition globale vers un métabolisme plus oxydatif. S'il n'a pas été démontré que l'on pouvait changer le phénotype contractile d'une fibre musculaire de type II (glycolytiques, rapide) vers des fibres de type I (oxydatives, lentes), une fibre de type IIb, très fortement glycolytique peut évoluer en fibre de type IIa dite « intermédiaire » (Bigard, et coll., 2000), plus oxydative.

Ainsi, le seul critère indubitable d'adaptation qualitative après entraînement est l'augmentation de la sensibilité à la créatine et donc de l'efficacité du système des créatine-kinases mitochondriales, en rapport avec une évolution du métabolisme énergétique vers un profil plus oxydatif.

#### ***D. Induction des PPARs à l'entraînement***

Dès 2000, une augmentation de la transcription de PPAR- $\alpha$  été montrée en réponse à l'entraînement (Horowitz, et coll., 2000). En 2003, Luquet et coll. montrent une augmentation de l'expression protéique de PPAR- $\delta$  à l'entraînement qui est presque triplée après six semaines d'entraînement à la nage (Luquet, et coll., 2003). Russell et coll. retrouvent une élévation de la transcription de PPAR- $\delta$  en période de récupération d'un exercice unique (Russell, et coll., 2005). Des diabétiques de type 2 soumis à un entraînement aérobie de quatre mois présentent une augmentation de l'expression protéique de PPAR- $\delta$  et d'UCP-3 (Fritz, et coll., 2006).

***L'entraînement en endurance engendre donc essentiellement une amélioration d'ordre quantitative aboutissant à l'augmentation des capacités oxydatives musculaires dont celles pour les acides gras. Pourtant, ceci est insuffisant pour expliquer le retard à la dégradation de l'oxydation préférentielle des lipides, lorsque l'on augmente la puissance d'exercice. L'augmentation de l'expression de PPAR- $\delta$  et de ses cibles transcriptionnelles fait penser que cette voie pourrait jouer un rôle dans cette adaptation.***

***Enfin, la particularité des adaptations concernant le métabolisme des AG évoque l'existence d'adaptations mitochondriales intrinsèques de nature qualitative. Cependant, la seule adaptation bien connue de ce type concerne le système de transfert de l'énergie de la créatine kinase mitochondriale et non l'utilisation des substrats.***

De plus, il a été décrit dans notre équipe, une activation de la transcription du facteur de croissance angiogénique (VEGF, pour vascular endothelial growth factor) à l'exercice (Biot, et coll., 2003) qui a été mise en rapport avec l'existence de foyers d'hypoxie dans le muscle au cours de la contraction musculaire. Aussi l'hypoxie par elle-même pourrait participer aux adaptations métaboliques observées.

## II. L'hypoxie

### A. Généralités sur le métabolisme énergétique en hypoxie

#### 1. Une transition métabolique vers les glucides ?

Depuis presque 40 ans, l'utilisation préférentielle de substrats en environnement hypoxique fait débat. Dès le début, deux hypothèses se sont côtoyées comme le montrent les titres des articles de Brooks 1991 et De Young 1982, respectivement « *Increased dependance on blood glucose after acclimatization to 4300m* » (Brooks, et coll., 1991) et « *Sparing effect of chronic high-altitude exposure on muscle glycogen utilization* » (Young, et coll., 1982).

La logique biochimique comptable justifie une oxydation préférentielle du glucose en situation de raréfaction d'oxygène compte tenu de la quantité d'énergie libérée par molécule d'oxygène consommée, qui est en faveur du glucose et au détriment des AG (cf :P43). Le raisonnement physiologique prend aussi en compte le fait que le stock en glycogène est rapidement épuisable et que le cerveau, à préserver absolument en situation d'hypoxie, est un organe exclusivement glucodépendant en aigu. Il s'agit de mettre en balance une épargne d'oxygène et une épargne de glucose, ce qui rend la question moins évidente.

Enfin, de nombreuses études s'intéressant à l'utilisation de substrats énergétiques en hypoxie ont été réalisées au cours d'une situation d'exercice et très peu conduites au repos. Or, la diminution de la  $VO_{2max}$ , observée lors d'une exposition à l'hypoxie (Fulco, et coll., 1998), augmente considérablement l'intensité relative d'un exercice à puissance absolue fixe. Comme nous l'avons vu avec le concept de point de croisement glucido-lipidique, une telle augmentation de l'intensité relative décale irrémédiablement l'utilisation de substrat vers les glucides. Aussi, la dépendance affichée aux glucides pourrait en fait être un biais expérimental lié à l'augmentation de la puissance relative de l'exercice réalisé en ambiance hypoxique.

Plus récemment, des études prenant en compte ce facteur confondant ne retrouvent pas d'accroissement de la consommation de glucides en hypoxie pourvu que l'on travaille à intensité relative constante (Lundby and Van Hall, 2002, McClelland, et coll., 1999). Mais encore maintenant, des études contradictoires persistent (Ou and Leiter, 2004, Peronnet, et coll., 2006).

***Cette question, bien qu'ancienne, de l'utilisation préférentielle d'un substrat glucidique ou lipidique par le muscle squelettique exposé in vivo à l'hypoxie reste encore non résolue à ce jour.***

Par ailleurs, il faut noter dès lors, que l'exposition à l'hypoxie s'accompagne d'une stimulation adrénergique, responsable d'une lipolyse précoce importante (Roberts, et coll., 1996). Par ailleurs, l'hypoxie s'accompagne d'une perte d'appétit, connue sous le nom d'anorexie d'altitude, qui entretient cette mobilisation des graisses lorsque l'exposition hypoxique se prolonge (Simler, et coll., 2007). De plus, il existe une augmentation des transporteurs membranaires aux AG lors d'une exposition à l'hypoxie (Chabowski, et coll., 2006). Ainsi, la disponibilité en AG dans la circulation ou dans le cytosol, ne serait pas un facteur limitant à l'utilisation des AG en hypoxie.

Enfin, il est pour l'instant difficile de mesurer la pression partielle en oxygène au niveau d'un muscle locomoteur au cours d'une exposition environnementale à l'hypoxie. Néanmoins, il semble que celle-ci puisse être moins importante comparativement à la baisse de  $PO_2$  observée au cours de l'exercice (Richardson, et coll., 2006).

***En résumé, si la question de l'orientation préférentielle en substrat au cours de l'exposition à l'hypoxie n'est pas tranchée, la participation respective du rôle joué par la stimulation hypoxique « per se » et par la restriction calorique n'est pas non plus évident.***

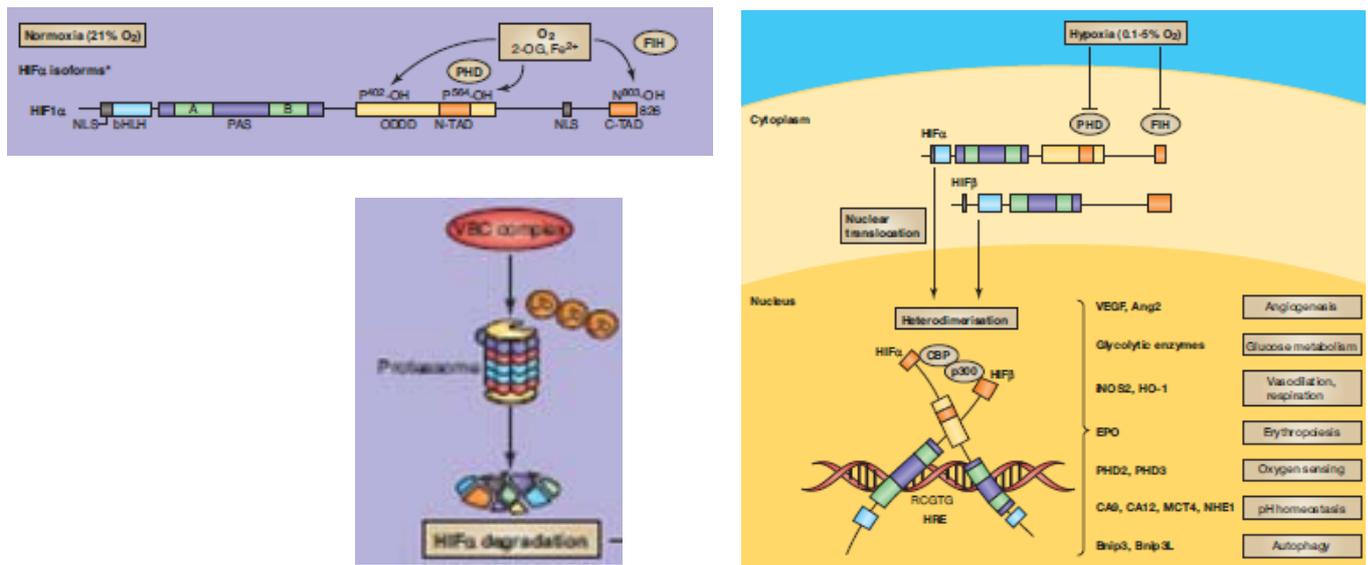
## 2. Théorie plus actuelle d'un frein sur la PDH

Si la dépendance au glucose a longtemps été de mise lorsque l'on parlait d'hypoxie, il est question, depuis peu, d'un « *Hypoxic reprogramming* » (Kelly, 2008). Cette théorie très en vogue prend naissance dans des données obtenues *in vitro* qui montrent une activation de PDK-1 en hypoxie inactivant ainsi la PDH (Kim, et coll., 2006, Papandreou, et coll., 2006). Depuis, une atténuation marquée de l'oxydation en pyruvate a été montrée chez des souris déficientes pour une prolylhydroxylase, présentant une activation continue d'Hif-2. Soumises à une ischémie du membre inférieur, les lésions musculaires s'en trouvent considérablement réduites (Aragones, et coll., 2008).

**B. Hif-1, une voie classiquement induite à l'hypoxie**

Stabilisation de Hif-1 à l'hypoxie et transcription de gènes oxygène-sensibles :

En normoxie, la protéine Hif-1 $\alpha$  est hydroxylée par une famille de prolyl-hydroxylases. Sous forme hydroxylée, Hif-1 $\alpha$  se lie à la protéine Von Hippel-Lindau qui achemine en permanence le complexe ubiquitine-protéasome où Hif-1 $\alpha$  est dégradée. L'activité des PDH est inhibée par la baisse de pression partielle en oxygène lors de l'hypoxie. Hif-1 $\alpha$  n'est alors plus dégradée et peut être stabilisée dans le cytoplasme d'où elle diffuse vers le noyau. Elle se lie alors à Hif-1 $\beta$  ; cet hétérodimère constitue la protéine Hif-1, facteur de transcription capable d'induire l'expression des messagers de gènes, possédant sur leur promoteur une séquence de liaison à Hif-1. Cette séquence, appelée « hypoxia responsive element » (HRE), a fait qualifier ces gènes de gènes « oxygène-sensibles ».



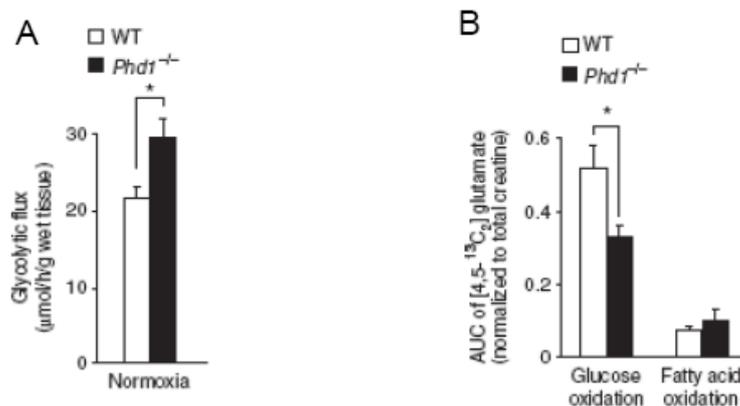
**Figure 31** : principe de la stabilisation d'Hif-1 $\alpha$  en hypoxie et transcription de gènes oxygène-sensibles par Hif-1, d'après Brahimi-Horn (Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2009)

Ses conséquences transcriptionnelles sur le métabolisme mitochondrial ont fait l'objet d'une revue de question de Semenza (Semenza, 2007) :

La glycolyse : plusieurs gènes de la glycolyse sont répondeurs à Hif-1 ; notamment le transporteur membranaire du glucose (Glut-1), l'aldolase, la phosphofructokinase ou encore l'énolase.

Le couple LDHA-PDK-1 : une des isoformes des pyruvate déshydrogénases kinases, PDK-1, est hypoxie-sensible, freinant l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie. L'induction concomitante du gène LDHA, codant pour la forme musculaire de la LDH, permet la formation de lactate à partir du pyruvate.

Ce couple est donc souvent interprété de façon finaliste, mais surtout réductrice, comme une facilitation de la glycolyse anaérobie comme source d'énergie pour tenter de limiter la production de radicaux libres (Figure 32A). Mais la question qui reste encore peu documentée, concerne la réalité de l'activation de cette voie : est-elle réellement active dans le muscle au cours d'une exposition chronique passive à l'hypoxie *in vivo* ?



**Figure 32** : modulation du métabolisme énergétique dans le muscle de souris présentant une activation d'Hif-2, d'après Aragonès (Aragonès, et coll., 2008)

A : stimulation du flux glycolytique.

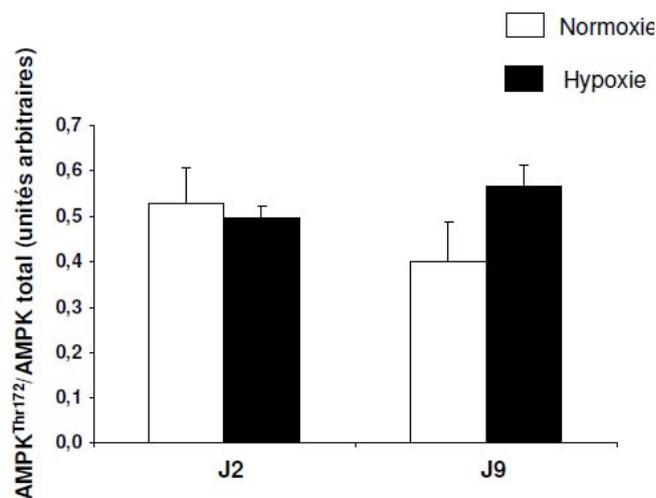
B : effondrement de l'oxydation du pyruvate et préservation de l'oxydation des AG

De plus, si le frein sur la PDH peut participer à l'augmentation d'un métabolisme anaérobie, une des conséquences « collatérales » peut être une augmentation compensatrice du flux d'AG, tout au moins relative, les AG devenant ainsi la source principale d'acétyl-CoA. Ainsi chez des souris déficientes pour l'isoforme 1 d'une prolyl hydroxylase déshydrogénase et qui présentent une stabilisation de Hif-2 y compris en normoxie on observe non seulement une

activation de la glycolyse au dépend de l'oxydation du pyruvate mais aussi une préservation de l'oxydation des AG (Figure 32B).

### C. L'activation de l'AMPK, mythe ou réalité ?

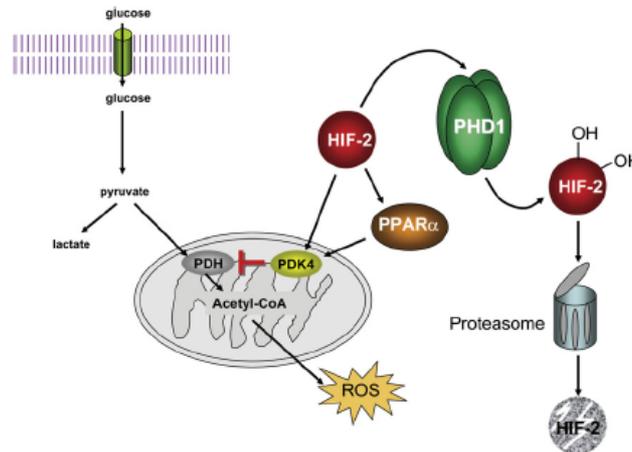
Parmi les affirmations souvent tenues comme acquises, l'activation de l'AMPK en est une sous-tendue par le fait que l'hypoxie induit un état de crise énergétique (Taylor, 2008). Néanmoins, si cette affirmation est avérée *in vitro* sur des cultures cellulaires exposées à moins d'1% d'oxygène, les choses sont moins évidentes *in vivo*. Ainsi plusieurs travaux du laboratoire, non encore publiés, n'ont pu mettre en évidence la phosphorylation de l'AMPK au cours d'une exposition à l'hypoxie, ni dans le myocarde (Letout, 2006) (pourtant soumis à une dépense énergétique importante du fait de l'augmentation de sa charge de travail), ni dans un muscle squelettique (données du laboratoire en cours de publications, Thomas Chaillou)



**Figure 33** : rapport des formes phosphorylées et totales de l'AMPK dans le plantaris de rats normoxiques ou exposés à une hypoxie à 10% d'oxygène.

### D. PPARs et UCP, des voies inattendues en hypoxie

La voie des PPARs : dans son modèle souris présentant une activation permanente d'Hif-2, Aragonès et coll. ont pu montrer une transcription du gène PDK-4 qui n'est, à la différence de l'isoforme PDK-1, pas connu pour être sensible à l'hypoxie. En utilisant un modèle de souris déficiente pour PPAR- $\alpha$ , il démontre que l'activation de PDK-4 lors de l'ischémie du membre inférieur est dépendante de la présence de PPAR- $\alpha$ , qui participe donc au tableau de l'exceptionnelle tolérance à l'ischémie décrite dans les muscles de ces souris (Aragonès, et coll., 2008).



**Figure 34** : activation de la voie PPAR à l'hypoxie d'après Dang (Dang and Gao, 2008)

*Cette nouvelle donnée pose donc la question du poids respectif des voies PPARs et Hif-1 dans l'inhibition de la PDH en situation d'hypoxie.*

Réponse des UCPs à l'hypoxie : lors de la présentation des UCPs, nous avons abordé une étude montrant une induction du messager d'UCP-3 dans le muscle après exposition aigüe à l'hypoxie (Zhou, et coll., 2000). Plus récemment, ces données ont été confirmées par une approche en Western Blot, qui retrouve une élévation de la protéine UCP-3, 4 heures seulement après une exposition à une altitude simulée de 8000 mètres. (Bo, et coll., 2008). Or, toutes ces dernières études présentées sont des données *in vivo* alors que les données ci-dessus sur Hif-1 et l'activation de la glycolyse sont obtenues *in vitro* et non *in vivo*.

Nous étudierons, dans deux situations reconnues comme modulatrices de l'orientation de substrats énergétiques, la plasticité métabolique mitochondriale et l'évolution de l'affinité pour les substrats énergétiques. De plus, nous combinerons ces deux situations, au cours de séances d'entraînement en endurance en hypoxie, afin de renforcer le stimulus hypoxique lié à l'exercice physique et à l'exposition environnementale (Richardson, et coll., 2006, Richardson, et coll., 1995).

# **OBJECTIFS SCIENTIFIQUES**

## Récapitulatif des problématiques ayant motivé la réalisation de ce travail

✧ Une spécificité tissulaire de l'affinité mitochondriale pour différentes catégories de substrats a été récemment mise en évidence (Ponsot, et coll., 2005) complétant ainsi les études ayant démontré la spécificité du transport membranaire des AG en fonction du phénotype musculaire, (Bonen, et coll., 1998), et celle de l'activité maximale de CPT-1 (Kim, et coll., 2002). En revanche, alors que les modulations de la densité mitochondriale, de l'affinité pour l'ADP ou de la sensibilité à la créatine ont été largement montrées, notamment en réponse à l'entraînement (Zoll, et coll., 2003, Zoll, et coll., 2002), on ignore encore à ce jour si l'affinité intrinsèque de la mitochondrie pour les substrats est modulable.

- **La première question à laquelle nous nous proposons de répondre est donc de savoir s'il peut exister une flexibilité métabolique de l'affinité mitochondriale pour ces substrats ?**

Pour cela, nous nous intéresserons à l'évolution de l'affinité pour des substrats glucidiques et lipidiques au cours de situations environnementales ou physiologiques connues comme potentiellement perturbatrices de l'utilisation préférentielle de substrats : l'hypoxie, la restriction calorique et l'état entraîné.

Cette question constitue la grande partie du travail réalisé dans l'étude n°1, et fait l'objet d'un article actuellement soumis. Elle court encore en filigrane à travers le travail, plus vaste de l'étude n°3.

✧ Si les bases moléculaires sur lesquelles repose cette affinité pour les substrats sont encore très mal connues, nous nous sommes cependant efforcés de détailler les étapes mitochondriales, régulatrices de l'oxydation des AG.

- **Nous sommes donc intéressés à l'identification des étapes potentiellement limitantes dans l'oxydation mitochondriale des AG dans des situations physiologiques s'accompagnant d'une forte mobilisation des AG, à savoir : l'entraînement en endurance et l'exposition chronique en hypoxie.**

Pour cela, nous avons proposé une approche originale de la fonctionnalité du transport mitochondrial des acides gras à longues chaînes en comparant les vitesses de respiration maximales et les affinités des fibres musculaires en présence de palmitoyl CoA ou de palmitoyl carnitine. Ces paramètres traduisant respectivement les capacités maximales mais aussi la facilité du transport CPT-1 et du transport en aval de CPT-1, regroupant les fonctions CPT-2 et carnitine-acyl translocase. Cette deuxième question fait l'objet d'une partie du travail de l'étude n°3.

Cette approche fonctionnelle a été complétée par l'étude du retentissement de ces « freins » du métabolisme oxydatif des acides gras sur les capacités d'endurance au cours d'un effort prolongé réalisé à puissance sous-maximale.

✧ Finalement, parmi l'ensemble des acteurs moléculaires pouvant être impliqués dans la préférence métabolique et largement détaillés dans l'état de la littérature, nous avons choisi d'étudier le rôle potentiel de PPAR- $\delta$  qui nous semble être le candidat le plus sérieux dans le muscle squelettique. En effet, malgré une littérature florissante sur cet acteur, une seule étude s'est intéressée à l'évolution de la fonctionnalité mitochondriale après un traitement de 8 jours avec un agoniste PPAR- $\delta$ , durée probablement un peu courte par rapport à la demi-vie estimée des mitochondries.

- **Le troisième point essentiel que nous avons abordé est celui du rôle de PPAR- $\delta$  sur le transport fonctionnel et l'oxydation des AGLC.** En d'autres termes, il s'agit de savoir si la capacité intrinsèque des mitochondries à oxyder les acides gras est augmentée par les agonistes PPAR- $\delta$ . Si tel est le cas, il faut distinguer si cette amélioration est liée à des facteurs transmitochondriaux (système de transport intramitochondrial CPT-dépendant), et/ou une modulation positive du contrôle intramitochondrial de l'oxydation des acides gras.

Pour y répondre, nous avons traité pendant trois semaines des rats avec un agoniste PPAR- $\delta$  puis étudié l'oxydation de deux acides gras à longues chaînes (le PC et PCoA dont le transport est respectivement indépendant ou dépendant de CPT-1), comparativement à l'oxydation maximale du pyruvate.

En complément, nous avons évalué, pour les situations décrites précédemment, l'implication de PPAR- $\delta$  dans l'activation des voies de signalisations métaboliques.

Deux approches ont été proposées:

- L'une « traditionnelle » consistant en l'étude, au cours des situations d'hypoxie et de restriction calorique, des modulations transcriptionnelles des cibles de PPAR- $\delta$ , impliquées dans les différentes étapes de l'oxydation des AG, ou de l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie. Ceci reste un travail essentiellement descriptif, présenté dans les études n°2 et n°3.
- L'autre, plus « intégrée » consistant à comparer les effets isolés ou combinés du traitement par l'agoniste PPAR- $\delta$ , des situations d'entraînement en endurance et d'exposition à l'hypoxie, sur la fonction mitochondriale. Bien que cet abord soit indirect, il permettra cependant de préciser le rôle de l'agoniste PPAR- $\delta$  dans ces conditions. L'absence de modulation, ou à l'inverse, l'existence d'une synergie ou d'un antagonisme seront informatifs quant à l'activation de voies de signalisations communes ou distinctes.

Nous aurons toujours à cœur d'intégrer ces résultats fondamentaux obtenus par une approche *ex vivo*, au retentissement métabolique systémique fourni par l'évolution de la composition corporelle, d'un bilan glucido-lipidique simple. Dans ce cadre, l'impact sur la performance aérobie sous-maximale, représente aussi une approche des capacités et des limites des muscles locomoteurs à utiliser des acides gras.

# **MATERIELS ET METHODES**

## **I. Conditionnement**

### ***A. Les modèles d'hypoxie utilisés***

#### 1. La chambre hypobare pour la stabulation

Les animaux ont été conditionnés dans une chambre hypobare mise en dépression à 500 mbar (altitude simulée de 5500m pour étude 1 et 2, 3200m pour étude 3) pour les groupes hypoxiques ou laissée à pression barométrique ambiante pour les groupes contrôles et « *pair-fed* ».

Chaque jour en milieu de matinée, la chambre hypobare était ramenée à pression ambiante pour effectuer la pesée des animaux et de leur nourriture ainsi que le remplissage des gamelles. Ces opérations duraient entre 45 et 90 minutes en fonction de l'altitude requise.

Les animaux « *pair-fed* » ont reçu la prise alimentaire moyenne quotidienne mesurée chez les hypoxiques, quantité à laquelle on ajoute 2g par jour afin de compenser le gaspillage.

#### 2. La tente à hypoxie hypoxique pour les entraînements

Les séances d'entraînement en ambiance hypoxique ont été réalisées dans une tente dont l'atmosphère est appauvrie en oxygène jusqu'à atteindre 14% d'oxygène soit une altitude simulée de 3200m.

### ***B. Le gavage***

#### 1. Le principe du gavage

Le traitement a été effectué par gavage, avec la molécule agoniste PPAR- $\delta$  de type GW 742, fournie gracieusement par le laboratoire Glaxo Smith Kline (GSK). Toutes les rates étaient gavées quotidiennement lors des 3 dernières semaines de conditionnement. Les groupes traités ont reçu 30 mg/kg/jour de molécule, les autres groupes ont reçu la même quantité du véhicule, employé pour la mise en suspension du GW 742 (composition en annexe 1). La solution de gavage a été réalisée à une concentration de 12 mg/mL, permettant un volume moyen de gavage de 500 $\mu$ l suffisamment faible pour assurer une bonne tolérance digestive mais tout de même suffisant pour éviter une erreur de mesure.

## 2. Les avantages de la suspension

Plutôt qu'une technique de dissolution, nous avons opté pour la réalisation d'une suspension aqueuse à base d'hydroxypropylmethylcellulose (composition en annexe 1). Ce composé présente plusieurs avantages. Premièrement, il n'existe pas de toxicité comme décrite avec une solution alcoolique ou avec le DMSO. Deuxièmement, la consistance obtenue est suffisamment visqueuse pour permettre une bonne sécurité de gavage sans besoin d'épaissir avec une huile. Enfin, la suspension est stable à + 40°C, ce qui permet sa préparation une fois par semaine. La remise en suspension avant gavage est effectuée par vortexage puis maintenue par un plateau à agitation.

### ***C. L'entraînement***

#### 1. Protocole

Les rats ont été entraînés cinq fois par semaine (avec 2 jours de repos le week-end) sur tapis roulant, pendant une période de 5 semaines. L'entraînement était appliqué avec une inclinaison de 10 degré du tapis. L'entraînement a été mené progressivement, autant en terme d'intensité (vitesse de course) que de durée. Il a été organisé en deux phases.

Après une habitude, les deux premières semaines d'entraînement ont été menées à une intensité proche de 70% de la vitesse maximale aérobie (VMA), suivies de trois semaines à une intensité de 80% et de durée allant jusqu'à 80 minutes (voir annexe 2).

#### 2. Calibration de l'entraînement entre normoxie et hypoxie

Pour assurer une intensité relative comparable entre l'entraînement mené en hypoxie et l'entraînement mené en normoxie, les intensités de course ont été adaptées en fonction de l'environnement. La réduction estimée de VMA étant d'environ 20% (Gonzalez, et coll., 1993) à une altitude de 3200m, les vitesses du protocole d'entraînement en hypoxie étaient égales à 80% des vitesses appliquées en normoxie.

#### 3. Evaluation de la performance en normoxie

Quelque soit l'environnement dans lequel les animaux ont été entraînés, l'évaluation de la performance a été réalisée en normoxie.

### 3.1 VMA

Les VMA étaient mesurées individuellement en fin de conditionnement pour tenir compte des variations interindividuelles des capacités aérobies ou des réponses à l'entraînement. Ce test VMA était un protocole de type triangulaire croissant, effectué à la place d'un entraînement chez les animaux entraînés.

### 3.2 Temps limite

Le test de temps limite était réalisé 48 heures après la VMA. Il correspond au temps maximal durant lequel les animaux étaient capables de maintenir un effort d'une intensité fixée à 65% de leur VMA. A la fin de leur test d'endurance, un prélèvement sanguin a été effectué à la queue ; le plasma a été séparé par centrifugation à +4°C à 400g pendant une durée de 10 minutes. A partir de ce plasma étaient mesurés les taux d'acides gras libres et la glycémie.

## II. Prélèvements

### *A. Les sacrifices*

#### 1. En hypoxie

Les prélèvements réalisés en hypoxie, étaient effectués dans une « boîte à gant » hypoxique à fraction d'azote enrichie à 89% afin de permettre l'étude ultérieure de facteurs de transcription labiles, induits par l'hypoxie.

#### 2. Méthode de sacrifice

Les animaux ont été sacrifiés à distance du dernier entraînement afin de s'affranchir des effets à court terme de l'exercice. Les rats ont été anesthésiés par injection intra péritonéale de pentobarbital sodique (1ml/kg de poids corporel). Les muscles soléaire, EDL et plantaris des deux pattes ont été prélevés puis pesés. Le tissu adipeux retro péritonéale ainsi que le foie ont été prélevés puis pesés. Un prélèvement de sang a été réalisé dans la bifurcation aortique abdominale. Le sang a été prélevé sur tube EDTA, centrifugé à 4°C et le plasma a été recueilli puis congelé à -20°C. L'animal a été sacrifié par exsanguination par ponction dans l'aorte abdominale.

## ***B. Les modes de préparation des tissus***

### 1. Tissus frais

Les muscles réservés à l'étude de la fonction mitochondriale par oxygraphie ont été conservés dans de la solution S (voir annexe 3) à +4°C avant dissection.

### 2. Tissus conservés

#### 2.1 RNA later

Une partie des muscles prélevés a été plongée dans une solution de protection des ARN (RNAlater Ambion®), placé 24 heures à +4°C puis congelé à -20°C pour l'étude des ARNm.

#### 2.2 Congélation

L'autre partie a été congelée d'emblée dans l'azote liquide puis placée à -80°C dans l'attente des mesures biochimiques d'activités enzymatiques.

## **III. Respiration mitochondriale *in situ***

### ***A. Principes***

La fonction mitochondriale a été étudiée *in-situ* sur des fibres musculaires préalablement individualisées sous loupe binoculaire puis perméabilisées à l'aide d'un détergent (saponine). Ce modèle a été préféré à celui des mitochondries isolées afin de préserver les interactions mitochondries-cytoplasme et cytosquelette. En effet, indépendamment de la présence de malonylCoA, l'activité optimale de CPT-1 nécessite une intégrité des rapports entre mitochondries et cytosquelette. Les mesures de consommation d'oxygène ont été effectuées à l'aide d'un système d'oxygraphie thermostaté Hansatech Instruments muni d'une électrode de Clark. La technique décrite ci-après, ses avantages et ses inconvénients ont récemment fait l'objet d'une mise au point (Kuznetsov, et coll., 2008).

### ***B. Préparation des fibres***

La dissection des fibres a été réalisée à +4°C, ainsi que les étapes suivantes de perméabilisation et de rinçage, qui se sont déroulées en chambre froide :

- Après le prélèvement des muscles, les fibres ont été disséquées sous loupe binoculaire dans

la solution « *Skinning* » (voir annexe 3) dont la composition correspond à celle du milieu intracellulaire, riche en phosphate et en énergie.

- La perméabilisation des cellules musculaires a été réalisée sous agitation pendant 30 min dans de la solution S contenant  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de saponine (détergent qui présente une affinité importante pour le cholestérol constitutif des membranes plasmiques). Cette opération également appelée «saponification» consiste à créer des pores dans les membranes sarcolemmales pour permettre la pénétration des substrats et des inhibiteurs utilisés dans les expériences oxymétriques. Le faible contenu en cholestérol des membranes mitochondriales les rend moins sensibles au détergent. Cependant, le temps de perméabilisation est essentiel à la bonne préparation des fibres. Dans ces conditions, seules les membranes des cellules musculaires sont perméabilisées, laissant intactes les membranes mitochondriales (cela est vérifiable par un test au cytochrome C qui permet de vérifier que cette hémoprotéine est bien toujours compartimentée dans l'espace inter-membranaire).

- Les lavages ont été réalisés sous agitation dans l'ordre suivant : 10 minutes dans la solution S afin d'éliminer la saponine, puis trois rinçages successifs de 5 minutes dans la solution  $R_0$  (voir annexe 3) pour laver les fibres de leur contenu en ADP et substrats endogènes. Cette solution  $R_0$ , d'une composition proche de la solution S, ne contient pas de composés à haut potentiel énergétique. En revanche, la présence d'albumine bovine à 0,2% permet la protection des fibres et des mitochondries de l'effet des protéases libérées par le muscle.

### ***C. Mesure de la consommation d'oxygène par oxygraphie***

Les fibres musculaires perméabilisées sont été placées dans une chambre d'oxygraphie contenant 1,5 mL de solution de respiration R, maintenue à  $+22^\circ\text{C}$  et agitée continuellement. L'injection des substrats et inhibiteurs a été réalisé grâce à des seringues de haute précision (seringues de type Hamilton). Chaque chambre était en contact à sa base avec une électrode à oxygène de type électrode de Clark. Cette électrode mesure la concentration d' $\text{O}_2$  présente dans la chambre, ce qui permet d'en déduire la consommation d'oxygène ( $\mu\text{mol d'O}_2.\text{min}^{-1}.\text{g poids sec}^{-1}$ ) des mitochondries placées hermétiquement dans la solution  $R_0$ . Au sein de la chambre, la réduction de l'oxygène au niveau de la membrane de l'électrode crée un courant électrique converti en concentration d'oxygène dissous par un polariseur. L'électrode était préalablement calibrée en deux points : un niveau équivalent à un 100% en  $\text{O}_2$  correspondant à la dissolution de l'oxygène dans l'eau à  $+22^\circ\text{C}$  ( $230 \text{mmol.L}^{-1}$ ), et un niveau équivalent à un

0% en O<sub>2</sub> mesuré après l'ajout d'un neutralisateur d'O<sub>2</sub> (dithionite de sodium). L'évolution de la concentration en O<sub>2</sub> dissous a été enregistrée par un logiciel spécifique permettant le calcul de la vitesse de consommation d'O<sub>2</sub>. En fin de protocole, les fibres ont été récupérées, séchées et pesées, afin d'exprimer les vitesses de consommation d'O<sub>2</sub> en  $\mu\text{mol d'O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de poids sec.

#### ***D. Les protocoles***

Afin de caractériser les capacités oxydatives maximales des muscles prélevés ainsi que leur affinité pour les substrats lipidiques (palmitoyl-CoA et palmitoyl-carnitine) nous avons utilisé trois protocoles de respiration.

##### ***Une cinétique au palmitoyl-CoA :***

<b>Ajout</b>	<b>Concentration dans la chambre (MicroM)</b>
Malate	500
Carnitine	1000
ADP	2000
Palmitoyl-CoA	10
Palmitoyl-CoA	25
Palmitoyl-CoA	75
Palmitoyl-CoA	150
Palmitoyl-CoA	250
Palmitoyl-CoA	400
Malonyl-CoA	50

Le palmitoyl-CoA (PCoA) est un acide gras à longue chaîne dérivé du palmitate. Pour pénétrer au sein de la mitochondrie, il va nécessairement emprunter le système de transport des carnitine palmitoyl transférase 1 et 2 (CPT-1 et CPT-2) situé dans la membrane mitochondriale. Une cinétique, c'est-à-dire des ajouts successifs de concentration croissante de cet acide gras va donc nous permettre de mesurer son niveau d'oxydation maximale et son affinité (K<sub>m</sub>). La détermination de ses valeurs est possible car la cinétique d'utilisation du

substrat répond à une cinétique dite « Mickaelienne ». En effet, l'équation de Michaelis-Menten permet de décrire la cinétique d'une réaction catalysée par une enzyme agissant sur un substrat unique pour donner un produit. Il est alors possible de modéliser cette cinétique, afin d'en recueillir les valeurs de  $V_{max}$  et  $K_m$  pour le substrat. Cette constante thermodynamique caractérisant une réaction enzymatique reflète l'affinité de l'enzyme pour son substrat selon le paramètre ( $1/K_m$ ).

Pour ce protocole, une injection saturante d'ADP a été effectuée avant la cinétique, afin de placer la mitochondrie en conditions phosphorylantes. Nous avons également effectué une injection à concentration saturante de carnitine ( $1000\mu\text{M}$ ) pour être sûr qu'une éventuelle limitation de la respiration par CPT-1 était bien liée à l'activité de ce transporteur et non à la disponibilité en carnitine.

L'ajout de malate permet le fonctionnement de la navette malate/aspartate, ce qui facilite l'entrée et la sortie des équivalents réduits de la mitochondrie. Le malonyl-Coa injecté en fin de cinétique est un inhibiteur partiel de l'activité de CPT-1. En mesurant cette diminution de respiration, l'objectif était de déterminer un effet du conditionnement sur la proportion de l'activité CPT-1 inhibable par le malonyl-CoA, ou insensible à cet inhibiteur.

#### ***Une cinétique au palmitoyl-carnitine :***

<b>Ajout</b>	<b>Concentration dans la chambre (MicroM)</b>
Malate	500
ADP	2000
Palmitoyl-DL-carnitine	10
Palmitoyl-DL-carnitine	25
Palmitoyl-DL-carnitine	50
Palmitoyl-DL-carnitine	100
Palmitoyl-DL-carnitine	150
Palmitoyl-DL-carnitine	250

Le palmitoyl carnitine (PC) est un acide gras à longue chaîne également dérivé du palmitate, mais déjà lié à une molécule de carnitine. Ainsi, il peut traverser la membrane externe de la mitochondrie, et être transporté au niveau du CPT-2, sans nécessité d'intervention de CPT-1. Comme pour la cinétique au palmitoyl-CoA, une injection saturante d'ADP et un ajout de malate ont été effectués en début de protocole. Le PC répond à la même cinétique « Mickaelienne », permettant après modélisation la détermination de son oxydation maximale et de son affinité.

De plus, la confrontation des valeurs obtenues lors de cette cinétique avec celles obtenues lors de la cinétique au palmitoyl-CoA, nous a permis d'évaluer la fonctionnalité du système des CPT et l'éventuelle limitation de CPT-1.

***Un protocole hydrate de carbone au pyruvate :***

<b>Ajout</b>	<b>Concentration dans la chambre (MicroM)</b>
Malate	4000
Pyruvate	2000
ADP	100
Créatine	20000
ADP	2000
Glutamate	10000
Succinate	25000
Amytal	1000

Le pyruvate a été préféré puisqu'il correspond à l'hydrate de carbone le plus physiologique. L'ajout de concentrations saturantes en glutamate et succinate en fin d'un protocole de courte durée permet de garantir l'obtention des capacités oxydatives maximales.

Ce protocole avait plusieurs objectifs :

- Déterminer le métabolisme basal, correspondant à une situation saturante de substrats, sans ADP, c'est-à-dire en condition non phosphorylante et qui représente donc le flux de protons dans la chaîne respiratoire sans phosphorylation de l'ADP.
- Déterminer une valeur maximale d'oxydation pour un substrat de type glucidique : le pyruvate.

- Estimer une affinité ( $K_m$ ) pour l'ADP grâce aux deux concentrations d'ADP selon la formule de calcul suivante :  $V_{adp} = (V_{max} \times [S]) / (K_m + [S])$
  - Calculer l'indice de l'activité du système des CK par le biais du niveau de stimulation de la consommation d'O<sub>2</sub> induit par l'ajout de créatine.
  - L'ajout de glutamate-succinate à concentrations saturantes a permis de mesurer les capacités oxydatives maximales
  - l'ajout d'amytal, qui est un inhibiteur spécifique du complexe 1 de la chaîne respiratoire nous a permis d'évaluer la respiration résiduelle initiée en succinate à partir du complexe II.
- Le contrôle régulier de l'intégrité des membranes mitochondriales a été réalisé par des tests au cytochrome-c réalisé en fin de protocole.

## IV. Biologie moléculaire

### *A. L'extraction d'ARN total*

L'extraction des ARN totaux a été réalisée selon le principe de la méthode d'extraction au phénol (Chomczynski and Sacchi, 1987). Un broyage en QIAzol® (tampon de lyse à base de thiocyanate de guanidine et de phénol ajouté à la concentration de 25 mg de muscle/500 µl de tampon) et une préextraction sur le principe d'une séparation de phases phénol-chloroforme ont été réalisés. La phase aqueuse était ensuite récupérée pour subir une extraction automatisée sur QIAcube®, utilisant le kit RNeasy® avec étape à la DNase.

Le dosage des ARN totaux a été réalisé par mesure de densité optique (DO) au moyen d'un spectrophotomètre. Le rapport de la DO à la longueur d'onde de 260 nm (correspondant à l'ARN) sur la DO à 280 nm (correspondant aux protéines) et le rapport de DO à 260 nm sur la DO à 230 nm (correspondant au phénol) ont permis de juger du niveau de pureté des ARN.

### *B. La reverse transcription*

C'est l'étape qui présente la plus grande variabilité en fonction de la quantité et de la qualité des ARN et du type d'amorce utilisé. Elle détermine donc en grande partie la reproductibilité de la PCR qui suit. L'ARN polymérase ARN dépendante ou reverse transcriptase est l'enzyme utilisée pour transcrire l'ARN en ADN complémentaire. La reverse transcription (RT) a été réalisée grâce au kit Reverse Transcription Core Kit (Eurogentec ®) et les amorces

utilisées étaient des oligodT qui se fixent sur la queue poly A des ARNm. Compte tenu de la variabilité des concentrations en ARN total extrait et de son influence sur le rendement de la RT, le volume de prise d'essai a été adapté afin d'assurer une quantité d'ARN déposée dans chaque réaction équivalent de 0,2 µg d'ARN pour 10µl de volume final.

### ***C. La PCR en temps réel***

#### **1. Principes**

La technique d'amplification par extension d'amorce ou « polymerase chain reaction » (PCR) a pour but de réaliser l'amplification proportionnelle et sélective d'une séquence d'ADN choisie. La PCR nécessite une ADN polymérase permettant la synthèse des brins d'ADN complémentaires à partir d'un couple d'amorce (l'une dit F pour « forward », l'autre R pour « reverse ») dont chacune se fixe sur un des deux brins de la séquence à amplifier (F sur le brin 5' ⇒ 3' et R sur le brin 3' ⇒ 5'). La spécificité des amorces garantit la spécificité de la séquence amplifiée. En théorie, la quantité d'ADN est multipliée par 2 à chaque cycle d'amplification : pour n cycles de PCR, la quantité est multipliée par 2<sup>n</sup>.

Pour cette étude, la PCR en temps réel a été réalisée sur un thermocycleur Lightcycler (Roche ®). La quantité d'ADN est évaluée par un niveau de fluorescence, engendrée par un agent intercalent, le SYBR green qui n'émet une fluorescence que lorsqu'il est incorporé dans un ADN double brin et s'éteint lorsqu'il est libre. Ainsi, au fur et à mesure des cycles de PCR et de l'amplification de l'ADN, la fluorescence augmente. La quantité d'ADN est alors exprimée en cycles de sortie (crossing point ou CP), c'est-à-dire le cycle de PCR auquel la fluorescence mesurée se différencie du bruit de fond.

La spécificité du produit amplifié est vérifiée par mesure de la température à laquelle la moitié de l'ADN amplifié se trouve déshybridé. Cette température, appelée température de fusion (melting temperature ou T<sub>m</sub>) dépend de la taille du fragment amplifié et de son contenu en GC, elle est donc spécifique du produit.

## 2. Les amorces

Le dessin des amorces a été systématiquement réalisé de façon à ce que les deux amorces se trouvent de part et d'autre d'une jonction d'exon, de façon à ne pas amplifier une éventuelle présence d'ADN génomique.

Les séquences des différentes amorces utilisées dans notre étude sont présentées dans l'annexe 4.

## 3. Quantification

La quantification des ARNm du gène cible ou gène d'intérêt se fait en théorie par rapport à un gène référence ou « gène domestique » dont l'expression est constante et non modifiée par le conditionnement des animaux. Comme ce gène « idéal » n'existe pas, une des solutions est d'utiliser plusieurs gènes références, régulés de manière différente et dont on effectue la moyenne géométrique (Bustin, et coll., 2009). Dans notre étude, nous avons choisi la Cyclophylène A (CycA), l'Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HPRT) et l'Acidic ribosomal protein P0 (ARBP). Pour s'assurer de la stabilité de nos gènes références, la variabilité de la moyenne géométrique a été vérifiée par le logiciel geNorm, et validé pour une valeur inférieure à 0,15 (Vandesompele, et coll., 2002).

En rapportant la quantité d'ADN du gène cible à celle des gènes références, on s'affranchit des variations de la quantité absolue d'ADN liée aux variations de rendement d'extraction et de RT. Ceci permet de normaliser le niveau d'expression du gène d'intérêt en fonction de la quantité de matériel génétique initialement présente dans chaque échantillon : c'est la méthode de quantification relative par delta de CP. Cependant pour tenir compte des variations de condition de PCR d'une réaction à l'autre et pouvoir comparer cette quantification relative en delta de CP d'un jour à l'autre, on utilise un « calibrateur » interne. Le calibrateur choisi ici est un pool constitué de l'ensemble des échantillons. C'est la quantification par delta de delta de CP (Livak and Schmittgen, 2001).

## V. Dosages enzymatiques

### A. L'activité citrate synthase

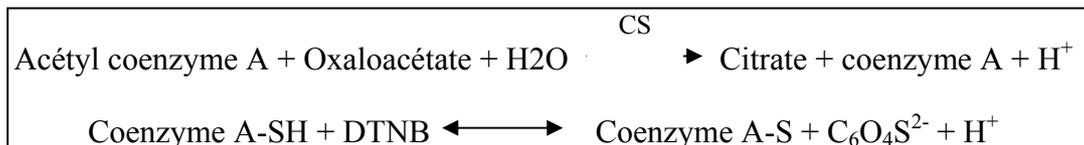
#### 1. Extraction des protéines

Une faible quantité de muscle (5 mg environ) dépourvue de tissu conjonctif et sans tendon était découpée puis pesée et placée dans un micro potter contenant 19 volumes de tampon d'extraction. L'homogénéisation a été réalisée dans le micro potter, sur glace. Après broyage, les extraits ont été incubés dans la glace pendant 1h, afin d'assurer une extraction complète des enzymes. Les extraits ont été ensuite conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  avec une quantité de tissu de 50 mg de tissu /mL. L'activité enzymatique de la citrate synthase (CS) des extraits a ensuite été déterminée par technique spectrophotométrique à partir des extraits dilués 5 fois dans du tampon d'extraction.

Pour la composition de la solution d'extraction, se référer à l'annexe 5.

#### 2. Dosage de l'activité de la citrate synthase (CS)

Le principe de la mesure par spectrophotométrie se base sur la réaction enzymatique suivante :



La cinétique d'apparition de l'ion mercaptide ( $\text{C}_6\text{O}_4\text{S}^{2-}$ ), qui absorbe à 412 nm est mesurée.

Au début de chaque série de mesures, une cuve contenant 1ml de tampon d'extraction (voir annexe 2 pour la composition) était présente afin de contrôler la stabilité de la mesure au cours de l'expérimentation.

Avant d'effectuer les mesures, les échantillons étaient dilués avec du tampon d'extraction au 1/5 pour les 3 types de muscles étudiés, soléaire, EDL et plantaris.

Une première mesure a été réalisée sur 970 $\mu\text{l}$  de tampon, 10 $\mu\text{l}$  d'échantillon dilué, 10 $\mu\text{l}$  de DTNB (4mg/ml du tampon de dosage) et 10 $\mu\text{l}$  d'acétyl-CoA 5mM (préparé dans l'eau). Cette mesure réalisée à une absorbance de 412 nm durant 3 minutes à  $30^{\circ}\text{C}$  a permis d'obtenir la valeur initiale de l'absorbance des cuves, appelée « le blanc ».

Ensuite, un ajout de 5 $\mu$ l d'oxaloacetate à 50mM permettait d'initier la réaction, reflétée par une modification de la densité optique. L'évolution de l'absorbance a été évaluée par des mesures répétées sur une période de 3 minutes pour permettre à la réaction d'atteindre son état d'équilibre.

Le coefficient directeur de la droite (absorbance par minute) de la première mesure a été retranché à celle de la seconde mesure.

L'activité de la CS a été calculée grâce à la loi de Beer-Lambert, en utilisant la concentration et le coefficient d'extinction molaire du C<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S<sup>2-</sup> ( $\Sigma = 13,6$  L/mmol/cm) et a été exprimée en unité internationale par gramme de poids frais.

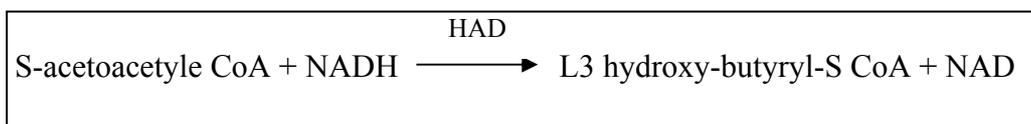
### ***B. L'activité 3-HAD***

#### 1. Extraction des protéines

L'extraction s'effectue de la même façon que pour le dosage de l'activité de la citrate synthase. Le tampon utilisé était différent; pour sa composition, se référer à l'annexe 5. L'extrait est cette fois passé pur après un passage d'une minute en centrifugeuse à 600 g.

#### 2. Dosage de l'activité de la 3-HAD

La méthode de dosage de cette enzyme est globalement la même que pour la citrate synthase. Et répond à la réaction enzymatique suivante:



A l'inverse de la CS, la variation de la densité optique se traduit par la mesure de la disparition du NADH et non par l'apparition de son équivalent oxydé le NAD. Les mesures ont été effectuées au spectre d'absorbance du NADH, ce qui correspond à une longueur d'onde de 340nm ( $\Sigma = 6,3$  L/mmol/cm), à 25° C pendant 5 minutes et ont été exprimées en unité internationale par gramme de poids frais.

# RESULTATS

# Etude 1 : modulation de l'affinité pour le palmitoyl carnitine en hypoxie

## I. Justification du travail

Bien que décrite depuis 2005, la technique de respiration mitochondriale *in situ* sur fibres musculaires perméabilisées permettant de définir l'affinité mitochondriale pour un substrat énergétique (Ponsot, et coll., 2005) n'a jamais été utilisée pour étudier l'évolution de l'affinité pour un substrat au cours d'un conditionnement susceptible de modifier l'orientation métabolique préférentielle. Par ailleurs, nous ne savons pas non plus si la plasticité métabolique peut concerner une telle adaptation qualitative intrinsèque aux mitochondries et si celle-ci peut dépendre du phénotype métabolique initialement présenté par le muscle.

Comme nous l'avons rappelé en introduction, la question de l'utilisation préférentielle d'un substrat glucidique ou lipidique par le muscle squelettique exposé *in vivo* à l'hypoxie, bien qu'ancienne, reste encore non tranchée à ce jour ; il en est de même des rôles respectifs joués par la restriction calorique et le stimulus hypoxique.

## II. Objectif

Nous nous sommes donc demandé si une exposition chronique à une hypoxie sévère était en mesure de modifier l'affinité pour des substrats de nature lipidique ou glucidique dans deux types de muscles squelettiques au profil métabolique différent, tout en nous efforçant de distinguer le rôle de la restriction calorique de celui de l'hypoxie.

## III. Plan expérimental

### *A. Résumé du plan expérimental*

Pour ce, nous avons choisi d'appliquer cette technique de respiration mitochondriale *in situ* avec des concentrations croissantes en substrats glucidiques ou lipidiques permettant une modélisation Michaelienne de la cinétique. Deux types de muscles, l'un très oxydatif, le *soleus* (SOL), l'autre essentiellement glycolytique, l'*extensor digitorum longus* (EDL), ont été choisis et les explorations menées pour 3 groupes d'animaux sédentaires :

- normoxiques *ad libitum* (N)
- hypoxiques (H), exposés trois semaines à une altitude simulée de 5500m soit 10% d'oxygène.
- normoxiques *pairfed* (PF), dont la prise alimentaire a été calquée sur celle des animaux hypoxiques.

### **B. Rappel sur la spécificité tissulaire et la typologie musculaire**

Ces deux muscles, EDL et SOL, sont caractérisés par un phénotype métabolique bien distinct, reporté dans le tableau 1. Ainsi, on observe que le muscle soléaire est composée exclusivement de fibres oxydatives (majoritaires de phénotype contractile lent) alors que l'EDL est composé de moins de 50% de fibres oxydatives et compte majoritairement des fibres rapides et glycolytiques (Benton, et coll., 2008).

#### **Muscle fibers composition (%) of rat hindlimb muscles**

Mean  $\pm$  S.E.,  $n = 9$ , except RG where  $n = 4$ , and RTA and WTA where  $n = 5-6$ . FOG means fast-twitch oxidative glycolytic; SO means slow-twitch oxidative; FG means fast-twitch glycolytic; and SOL means soleus.

Muscle fiber (%)	Skeletal muscle						
	EDL	RTA	WTA	SOL	PL	RG	WG
Oxidative <sup>a</sup>	42.6	76.8	19.9	100	43.9	89.4	16.1
(FOG + SO)	$\pm 2.8$	$\pm 2.3$	$\pm 4.0$	$\pm 0$	$\pm 4.2$	$\pm 2.0$	$\pm 1.0$
FOG	38.7	68.7	19.9	31.1	37.1	68.4	16.1
	$\pm 0.8$	$\pm 2.0$	$\pm 1.9$	$\pm 2.4$	$\pm 3.7$	$\pm 3.9$	$\pm 1.0$
SO	3.9	8.1	0	68.9	6.8	21.0	0
	$\pm 0.8$	$\pm 0.8$	0	$\pm 2.0$	$\pm 0.8$	$\pm 3.1$	0
FG	57.4	23.2	80.1	0	56.0	10.6	83.9
	$\pm 2.9$	$\pm 1.9$	$\pm 1.9$	0	$\pm 4.2$	$\pm 1.1$	$\pm 1.0$

<sup>a</sup> The oxidative muscle fiber composition of the differing muscles was based on summing the FOG and SO muscle fiber content of each muscle.

**Tableau 1** : composition des muscles des membres inférieurs chez le rat (Benton, et coll., 2008). - Valeurs sous forme de moyenne  $\pm$  esm.

*RTA* : portion oxydative du tibialis antérieur - *WTA* : portion glycolytique du tibialis antérieur - *RG* : portion oxydative du gastrocnémien - *WG* : portion glycolytique du gastrocnémien

Outre cette différence de métabolisme énergétique, le SOL est un muscle profond de la loge postérieure, à fonction posturale, et donc soumis à un régime de contraction lent mais quasi

permanent, ce qui n'est pas le cas de l'EDL qui est un muscle phasique de la loge antérieure de la patte.

## IV. Résultats et éléments de discussion

### A. Morphologie et biochimie plasmatique

La perte de poids corporel qui accompagne l'exposition à l'hypoxie est essentiellement liée à la réduction spontanée des apports alimentaires, et se fait essentiellement aux dépens de la masse grasse (*Table 1* de l'article). Si ces variations sont retrouvées à la fois chez les hypoxiques et chez les *pairfed*, on retiendra néanmoins que la fonte de masse grasse est significativement plus importante chez les animaux hypoxiques. Cette différence accrue chez les animaux hypoxiques comparativement aux animaux *pairfed* est d'autant plus surprenante que, lors des premiers jours d'exposition à l'hypoxie, les animaux présentent une hypoactivité alors que les animaux normoxiques que l'on restreint en apport alimentaire présentent une attitude de recherche de nourriture avec hyperactivité motrice (Bigard, et coll., 2000). Aussi, à apport calorique équivalent, la dépense énergétique étant plus grande chez les animaux *pairfed* que chez les animaux hypoxiques, ces derniers présentent une balance énergétique moins déséquilibrée. Ceci peut par contre participer à l'observation d'une élévation des AGL plasmatiques persistante uniquement dans le groupe *pairfed*.

Néanmoins, après vingt et un jours de conditionnement, cette différence de balance énergétique entre animaux *pairfed* et hypoxiques s'est nettement émoussée, les animaux hypoxiques étant sortis de leur « léthargie » et les animaux *pairfed* nettement moins restreints en apport alimentaire que durant les premiers jours. Enfin, il ne faut pas perdre de vue que la concentration plasmatique des AGL est le résultat d'un flux entrant représenté par la lipolyse du tissu adipeux blanc et d'un flux sortant représenté essentiellement par la consommation d'AG par les organes et pour laquelle les muscles squelettiques contribuent à hauteur de 30 à 40 %.

### B. Absence d'altération quantitative mitochondriale

Il n'existe pas d'altération quantitative mitochondriale après vingt et un jours d'exposition à l'hypoxie, ce qui se traduit par un maintien des capacités oxydatives globales, qu'elles soient

évaluées par la mesure d'une activité enzymatique du cycle de Krebs, la citrate synthase (CS), ou par l'oxydation maximale en utilisant le pyruvate et le glutamate comme substrats (*Table 2* de l'article).

La restriction calorique, même si elle est modérée après trois semaines de *pairfeeding* (environ 15% d'apport énergétique en deçà des animaux *ad libitum*), ne s'accompagne pas d'une augmentation des capacités oxydatives globales comme cela a pu être décrit dans certaines études (Nisoli, et coll., 2005) mais qui correspondent à des durées plus longues et des intensités de restriction calorique plus marquées.

### ***C. Une adaptation quantitative dissociée et spécifique de la nature du substrat***

#### **1. Effet propre de l'hypoxie**

Ainsi, les capacités oxydatives maximales en palmitoyl-carnitine (PC) sont spécifiquement augmentées par l'exposition à l'hypoxie dans le SOL comme dans l'EDL alors qu'il n'existe pas d'augmentation de l'oxydation maximale en G3-P ou en pyruvate, substrats glucidiques respectivement étudiés dans l'EDL et le SOL. Cette augmentation survient en l'absence même de modification de l'activité de la 3-HAD, enzyme pourtant considérée comme limitante de la  $\beta$ -oxydation. Néanmoins, s'il s'agit effectivement d'une enzyme limitante pour l'octanoate, AGCM, l'oxydation d'un AGLC comme le PC s'il ne dépend pas du transport CPT-1, nécessite pour autant un système CAT-CPT-2 fonctionnel. Nous reviendrons dans l'étude 3 sur les différentes étapes - du transport à l'oxydation des AG - potentiellement limitantes en fonction des situations dont celle d'hypoxie.

#### **2. Effet de la restriction calorique**

La restriction calorique (observée chez les animaux *pairfed*) a des effets opposés sur l'oxydation du pyruvate dans le SOL (abaissée) et du G3-P dans l'EDL (augmentée). La réduction de l'oxydation du pyruvate a été classiquement décrite dans une situation de jeûne, surtout dans un muscle oxydatif (Bissonnette and Jeejeebhoy, 1998) et semble cohérente avec l'épargne de glucose attendue de la part d'un muscle insulinosensible exposé à une situation d'insulinopénie. Il faut néanmoins noter que la situation de *pairfeeding* n'est pas une situation de jeûne surtout à trois semaines où la phase de renutrition a déjà fait suite à la phase initiale de privation drastique. (Zhang, et coll., 2007, Zhang, et coll., 2007)

L'augmentation de l'oxydation du G3-P dans l'EDL en situation de restriction calorique est, elle, moins attendue. Cependant, la baisse de la glycolyse lors du jeûne ne semble pas aussi systématique dans un muscle glycolytique que dans un muscle oxydatif (Bissonnette and Jeejeebhoy, 1998). Ainsi Daneshdrad décrit, uniquement dans le muscle gastrocnémien blanc, une augmentation des activités phosphofruktokinase et pyruvate kinase chez des animaux *pairfed* comparés à des animaux hypoxiques qui présentent eux une activité glycolytique comparable aux animaux *ad libitum* (Daneshdrad, 1999). Cependant, que le flux glycolytique soit accru n'en rend pas moins interpellante, l'augmentation de l'oxydation du G3-P. S'il existe effectivement une captation majorée du glucose (Wetter, et coll., 1999) dans l'EDL avec un frein sur la PDH, limitant le flux entrant de pyruvate dans la mitochondrie (Wu, et coll., 2001), alors on peut imaginer que la voie du glycérol-3P soit une dérivation à l'accumulation de phosphodihydroacétone au même titre que celle du lactate (Lambert, et coll., 2003). Cependant, cette hypothèse mériterait d'être vérifiée par une cinétique du pyruvate dans l'EDL afin de dissocier une éventuelle activation de la glycolyse d'un frein en aval sur la PDH comme on le pressent dans le SOL.

De plus, il est remarquable que l'altération de l'oxydation maximale en pyruvate observée dans le SOL en réponse à la restriction calorique ne soit pas retrouvée en hypoxie. Quoiqu'il en soit, les adaptations spécifiques des AG enregistrées à l'hypoxie ne se font donc pas aux dépens d'une altération pour l'oxydation du pyruvate ou du G3-P.

#### ***D. Une meilleure affinité pour le PC après exposition à l'hypoxie***

Outre l'augmentation des capacités oxydatives en PC, il existe une baisse du Km témoignant d'une amélioration de l'affinité pour ce substrat après trois semaines d'exposition à l'hypoxie. Si cette augmentation d'affinité pour le PC est retrouvée dans les deux muscles hypoxiques, elle n'est significativement différente de l'effet du *pairfeeding* que dans l'EDL. Quoiqu'il en soit, ces adaptations qui portent à la fois sur une augmentation de la Vmax et du Km dénotent un véritable processus proactif au sein des systèmes enzymatiques et pas seulement un simple décalage du Km consécutif à une plus grande quantité d'enzyme. Parmi les hypothèses actuelles participant à l'utilisation préférentielle de substrat par la mitochondrie, nous reviendrons notamment sur le rôle potentiel joué par la protéine UCP-3.

Il n'existe en revanche aucune adaptation qualitative concernant l'affinité pour les substrats glucidiques.

### ***E. Une réponse tissu-spécifique***

A l'état basal chez les animaux *N ad libitum*, la différence sur l'oxydation du PC entre EDL et SOL concerne essentiellement les capacités oxydatives maximales pour ce substrat avec une faible variation de  $K_m$ . Ceci évoque en premier lieu une différence liée à la quantité de mitochondries et donc d'enzymes présentes dans ces deux types de muscles.

Par contre, il existe un effet plus marqué sur l'oxydation du PC dans l'EDL hypoxique que dans le SOL tant sur les capacités oxydatives maximales en PC que sur l'amélioration de la sensibilité pour ce substrat. Nous reviendrons en détail sur cette spécificité tissulaire de la réponse hypoxique dans la discussion générale après avoir pris en compte les éléments de réflexion apportés par l'étude 2.

### ***F. Signification de nos résultats en physiologie intégrée***

L'augmentation des capacités oxydatives maximales pour le PC est associée à une meilleure affinité pour ce substrat après exposition à l'hypoxie. D'autre part, la masse grasse viscérale a diminué alors que les AGL plasmatiques se sont normalisés. Même si ces résultats peuvent évoquer une utilisation accrue des AG *in vivo*, il est trop prématuré pour pouvoir retenir cette conclusion à cette étape de notre travail. Ainsi, l'effet observé ne concerne qu'un AGLC dont le transport est indépendant de CPT-1. Or il a été décrit par le passé une altération possible de l'activité CPT-1 en hypoxie (Galbes, et coll., 2008, Kennedy, et coll., 2001). Aussi nous discuterons de la transposition de nos résultats *in situ* obtenus sur fibres musculaires perméabilisées à ce qui se passe à l'échelle d'un organisme entier en fin de travail.

## **V. Article soumis**

## **Enhancement of long chain fatty acid oxidation in skeletal muscle mitochondria after chronic hypoxia**

Malgoyre A.\*<sup>1</sup>, Sanchez H.<sup>1</sup>, Tonini J.<sup>1,3</sup>, Koulmann N.<sup>2</sup> and Bigard X<sup>1</sup>.

1 Département des Environnements Opérationnels, Institut de recherche biomédicale des Armées IRBA, antenne de la Tronche BP87, 38702 La Tronche Cedex, France

2 Département des Environnements Opérationnels, Institut de recherches biomédicales des Armées, 91223 - Brétigny-sur-Orge, France

3 Laboratoire Hypoxie Physiopathologie cardiovasculaire et respiratoire, Inserm U-1042, Institut Jean Roger, BP 170, 38042 Grenoble Cedex 9, France

### **Corresponding author:**

Alexandra MALGOYRE

Département des Environnements Opérationnels

Institut de recherches biomédicales des Armées, antenne de la Tronche

BP87

38702 La Tronche Cedex, France

Phone : (+334) 76 63 97 67

Fax : (+334) 76 63 97 67

E-mail : [a.malgoyre@crssa.net](mailto:a.malgoyre@crssa.net)

**Running title.** mitochondrial function and prolonged hypoxia

**Keywords:** palmitoyl carnitine, oxidative capacities, mitochondrial respiration, caloric restriction

**ABSTRACT**

The purpose of this study was to examine the effects of hypoxia on the maximal use and sensitivity of mitochondrial respiration to different substrates in slow-oxidative (soleus, SOL) and fast-glycolytic (extensor digitorum longus, EDL) muscles. We explored the maximal oxidation rate of palmitoyl-carnitine (PC) and pyruvate by mitochondria maintained *in situ* in chemically skinned fibers from SOL muscles, and the mitochondrial sensitivity to these substrates. Maximal respiration rates with PC and glycerol-3-phosphate were determined in EDL muscles. Rats were randomly assigned to three experimental groups (n=8 each), and subjected to hypobaric hypoxia (H, equivalent to a simulated altitude of 5,500m, 50.5kPa), caloric restriction (PF, reproducing the effects of hypoxia-induced anorexia), or maintained *ad libitum* under control barometric pressure conditions (N) for 3 weeks. Neither hypoxia exposure nor moderate food restriction affected the maximal oxidative capacities measured by mitochondrial respiration and enzyme activities in skeletal muscles. In EDL the maximal respiration rate ( $V_{\text{substrate}}$ ) for PC was higher in H animals, compared with both N and PF rats ( $P<0.05$ ). Similarly  $V_{\text{substrate}}$  for PC was higher in H group than in PF animals in SOL ( $P<0.01$ ). These findings were specifically due to hypoxia *per se*, independently of caloric restriction. Apparent  $K_m$  values for PC were lower in H than in N group, in both SOL and EDL, corresponding to increased sensibility for this substrate (30%,  $P<0.01$ , 46%,  $P<0.001$ , respectively). In conclusion, hypoxia enhanced the ability of skeletal muscle to oxidize more and preferably long-chain fatty acids, independently of alterations in mitochondrial density.

## INTRODUCTION

The way as skeletal muscles cope with decreased oxygen availability to maintain fuel supply elicits a number of metabolic adjustments. Compared with sea level condition, prolonged exposure to altitude in humans has been suggested to increase blood glucose dependence (12), associated with a decreased fatty acid oxidation (38, 42). However, these findings remain controversial since several studies have suggested that acclimatization to high altitude results in an unchanged or even greater rate of fat oxidation, thereby sparing muscle glycogen (21, 31-33). Moreover, exercise in acclimatized men has been associated with increased mobilization and use of free fatty acids (20, 55), and decreased carbohydrate utilization (11).

Competition between glucose and fatty acid for their oxidation in skeletal muscle through the glucose-fatty acid cycle has been recently revisited, evidencing new molecular insights of fuel selection (23). Complex mechanisms interact, involving both the sarcolemmal transport of substrates, and the control of long-chain fatty acids (LCFA) entry in mitochondria, and/or fatty acid oxidation. Prolonged hypoxia exposure is known to increase plasma fatty acids availability, but only few data addressed the question of the control of the LCFA mitochondrial transport (13). An impairment of both muscle carnitine palmitoyl transferase (mCPT-1) content and activity has been evidenced specifically in fast-twitch muscles after hypoxia acclimatization in rats (18, 24).

Besides the cytosolic events that control the transfer of LCFA into the mitochondria, the organelle plasticity obviously plays a crucial role to respond to long-term exposure to hypoxia (22). Findings concerning the effect of prolonged hypoxia on metabolic enzymes activities in animal models remain contradictory, with either a lack of change in CS activity, a marker of mitochondrial density within skeletal muscles (1, 6, 14, 37), or a down-regulation of enzymes of the tricarboxylic acid cycle (TCA) (16).

In parallel with alterations in mitochondrial density, metabolic modulations induced by chronic changes in oxygen availability can also result from qualitative adjustments, such as mitochondrial sensibility to ADP (25, 49), functional properties of the creatine kinase system (50), or the intrinsic substrate preference (40). Because glucose oxidation is more economic

than fatty acid use in regard to oxygen consumption and ATP production, it would be the preferential substrate during hypoxia exposure. However, it has been suggested that the pyruvate kinase-1 (PK1) is a hypoxia-responsive protein (36). The increased expression of this kinase downregulates the activity of the pyruvate dehydrogenase (PDH), member of the pyruvate dehydrogenase complex (PDC) located in the mitochondrial matrix, and then decreases the pyruvate entry into the TCA cycle (47). This also could facilitate fatty acid use instead of pyruvate as source of acetylCoA in the Krebs cycle. A previous study demonstrated that mitochondria exhibit a tissue-specificity regarding the response and sensitivity of respiration to specific substrates representative of glucose or fatty acid oxidation (40). Whether prolonged exposure to ambient hypoxia affects the intrinsic substrate preference that has been reported for different skeletal muscles remains to be examined *in vivo*.

An important confounding factor that affects the physiological responses to ambient hypoxia is the well-known hypoxia-induced hypophagia (7, 45). Caloric restriction may enhance the mitochondrial oxidative capacity in skeletal muscle (5, 34). Moreover, starvation has been shown to result in inhibition of PDC, the rate limiting step in pyruvate oxidation in skeletal muscle, then altering fuel selection towards fatty-acid oxidation (53). In addition to global effects of the prolonged exposure to hypobaric hypoxia, it was therefore important in the present study to distinguish the effects of hypoxia *per se* from those related to decreased energy intake.

The primary purpose of the present study was to determine whether prolonged exposure to ambient hypoxia affects the sensitivity of mitochondrial respiration to different substrates, in slow and fast-twitch muscles. In order to evaluate the qualitative response of mitochondria to hypoxia, we explored the capacity of substrate utilization of mitochondria maintained *in situ*. Chemically skinned fibers allow assessing the whole mitochondrial mass

and preserve the cytoskeleton–mitochondria interactions, the compartmentalization of energetic pathways within the cell, as well as mitochondrial regulations (26). In the present study, we examined the maximal oxidation rate and mitochondrial sensitivity to palmitoyl-carnitine (PC) and glycerol-3-phosphate (G3-P) in the fast-glycolytic extensor digitorum longus (EDL) muscle, and pyruvate (Pyr) and PC in the slow-oxidative postural soleus (SOL) muscle (40). Our intention was to identify the hypoxia-induced changes in the ability of mitochondria to use specific substrates, independently of substrate availability or alterations in the control of substrate entry into mitochondria. Moreover, to ensure that the effects observed on substrate oxidation can only be attributed to hypoxia *per se*, a pair-fed group of rats was used, kept under normoxic conditions and receiving a food supply equivalent to that consumed by animals subjected to ambient hypoxia.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals and experimental design**

This study was performed in accordance with both the Helsinki accords for human treatment of laboratory animals and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Council of Europe no. 129, Strasbourg, 1985), and was approved by the local Animal Ethics Committee of our research center. Male Wistar rats (weighting 255–270g) obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresles, France) were used in this experiment. All animals were housed individually in hanging wire-mesh cages on an artificial 12:12-h light-dark cycle. After 1 week of acclimatization, rats were randomly assigned to three experimental groups (n=8 each), either submitted to hypobaric hypoxia (H), maintained under local barometric pressure conditions (N), or pair-fed (PF) with an equivalent quantity of food to that consumed by H rats.

Animals from H group were housed in a hypobaric chamber (T.I.M., Marseille, France) and exposed to barometric pressure that was progressively reduced until the equivalent of 5,500m altitude was reached (barometric pressure 50.5 kPa, partial oxygen pressure 10.3 kPa). They were maintained under hypobaric condition during 21 days, with ambient temperature at  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Both N and H rats had free access to water and standard laboratory chow in powder (AO3 UAR, Charles River, Les Oncins, France). Rats were daily weighed and food intake of H rats was monitored to give the same amount of food to PF rats.

### **Surgical procedures**

At the end of the 3-weeks period animals were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (50mg / 100g body weight). Blood samples were withdrawn from the abdominal aorta into a syringe, collected on EDTA, and kept in ice to further plasma biochemical measures. SOL and EDL muscles were excised immediately before

exsanguination. Right muscles were put in Krebs solution composed of 118 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, for mitochondrial respiration experiments, and the left ones were quickly frozen in liquid nitrogen for biochemical assays.

### **Biochemical measures**

Plasma, non esterified free fatty acids (FFA), was measured by enzymatic methods on an automated biomedical analyzer (Roche-Hitachi 912, Meylan, France).

### **Specific enzyme activities**

Frozen tissue samples were weighed, homogenized in ice-cold buffer (50 mg/ml) containing 5 mM HEPES (pH 8.7), 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.1% Triton X-100 and incubated for 60 min at 0°C to ensure complete enzyme extraction. Determination of citrate synthase (CS) activity was assayed at 30°C, (pH 7.5) by using coupled enzyme systems as previously described by Srere (46). For 3 hydroxyl acyl coenzyme A dehydrogenase (3-HAD), extraction was made in ice-cold phosphate 300mM buffer (50 mg/ml) containing KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.7) with BSA 0.05%. Enzyme activity was determined by using NAD/NADH enzymatic fluorometric test at 25°C according to the Lowry and Passonneau method (29). Enzyme activities were expressed as micromoles substrate per minute that is UI per gram wet weight.

### ***In situ* study of mitochondrial respiration**

The mitochondrial respiration was studied *in situ* in saponin skinned fibers as previously described (26). Briefly, fibers are separated under binocular microscope in solution S (see below) at +4°C and permeabilized in solution S with 50 µg.ml<sup>-1</sup> of saponin for 30 min, since placed 15 min in solution R (see below) to wash out adenine nucleotides and creatine

phosphate (PCr). For each muscle, 3-8 mg of skinned fibers were registered at +22°C with a Clark electrode (Hansatech Oxygraph Instruments, Norfolk, England) under continuous stirring, in 1.5 ml of respiration solution. After measurement, fibers were removed, dried, and weighed. Respiration rates were expressed as micromoles of oxygen per minute per gram of dry weight ( $\mu\text{mole O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dw}$ ).

Solutions R and S contained: 2.77 mM  $\text{CaK}_2\text{EGTA}$ , 7.23 mM  $\text{K}_2\text{EGTA}$  (100 nM free  $\text{Ca}^{2+}$ ), 6.56 mM  $\text{MgCl}_2$  (1 mM free  $\text{Mg}^{2+}$ ), 20 mM taurine, 0.5 mM DTT, 50 mM K-methane sulfonate (160 mM ionic strength), 20 mM imidazole (pH 7.1). Solution S also contained 5.7 mM  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , 15 mM creatine-phosphate, while solution R contained 3mM phosphate, 2mM ADP, and  $2\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  fatty acid-free bovine serum albumin.

## Protocols

Mitochondrial metabolism was studied using two types of protocols. The first one is a cumulative protocol designed to determine maximal oxidative capacities ( $V_{\text{max}}$ ) by adding different substrates in presence of 2mM ADP. For SOL, substrates were sequentially added as previously described (4), and as follow : 8 mM glycerol 3 phosphate (G3-P), 4 mM malate, 0.2 mM palmitoyl DL carnitine (PC), 1 mM pyruvate (Pyr), and 10 mM glutamate, from the less used to the most used. For EDL muscle, G3-P was administrated after PC.

The second protocol was aimed to calculate the sensitivity ( $1/K_m$ ) and the maximal respiration rate ( $V_{\text{substrate}}$ ) for PC and G3-P in EDL and for PC and Pyr in SOL (adapted from (40)). G3-P oxidation remained at very low levels in SOL, in such a way that it was impossible to fit a Michaelis-Menten model and to obtain confident values of  $V_{\text{substrate}}$  and  $K_m$ . In the present study, G3-P was replaced by Pyr, another substrate representative of glucose oxidation. Stepwise additions of G3-P (1–6 mM), Pyr (0.05–2 mM), PC (10–250  $\mu\text{M}$ ), were done until the maximal respiration rate was reached in the presence of 2 mM ADP.

Under these conditions, the available substrate concentration is the only limiting factor of respiration.  $K_m$  values were calculated using a non-linear mono-exponential fitting of the Michaelis–Menten equation for each substrate, skeletal muscle and experimental group.

### **Statistical analysis**

Data are presented as mean  $\pm$  SE. One way analysis of variance (ANOVA) was used to determine the global effect of experimental conditioning. When appropriate, differences between groups were tested with a Newman-Keuls post hoc test. Differences between skeletal muscles for  $V_{max}$  and  $K_m$  values were assessed using a Student's *t*-test. Statistical significance was accepted at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Morphological and plasma biochemical values (Table 1).

Although initial body weight (BW) was similar between groups, the final BW of H animals was 18% lower than that of N rats ( $P<0.01$ ). Body growth rate was slower in H than in N group ( $P<0.001$ ). The same trend was observed in PF rats, with a final BW 20% lower than in N group ( $P<0.01$ ). Hypoxia exposure markedly reduced by 26% the final fat pad weight ( $P<0.05$ ), in comparison with N rats, while PF animals exhibited a slight lower fat loss in comparison with N rats (18%, NS). A marked increase in plasma free fatty acid occurred in PF rats in comparison with N animals ( $P<0.01$ ). Interestingly, the decreased weight of adipose tissue observed in H rats was not associated with detectable changes in free fatty acid concentration. Hematocrit values were higher in H than in both N and PF rats ( $P<0.001$ ), with no difference between the latter groups.

### Citrate synthase and 3-HAD activities (Table 2)

While CS activity is usually considered as a good marker of the mitochondrial content, the 3-HAD activity is representative of fatty acid oxidation. CS and 3-HAD activities were higher in SOL, representative of slow-oxidative muscles, than in EDL, representative of fast-glycolytic muscles. Neither hypoxia exposure nor food restriction affected CS or 3-HAD activities in SOL or EDL.

### Mitochondrial function

Maximal oxidative capacities as expressed as  $V_{max}$  were higher in SOL than in EDL muscles, due to the high mitochondrial content expected in slow-twitch skeletal muscle (Table 2). Consistent with the lack of change detected in CS activity, neither hypoxia exposure, nor food restriction alone affected  $V_{max}$  values.

In SOL muscles,  $V_{\text{substrate}}$  for Pyr was approximately 2 times higher than for PC. The maximal respiration rate with Pyr was decreased in PF compared with N rats ( $P < 0.05$ ) (Table 3). Moreover,  $V_{\text{substrate}}$  for PC was higher in H than in PF group ( $P < 0.01$ ).

In EDL muscles,  $V_{\text{substrate}}$  was nearly 2 times higher for G3-P than for PC, consistent with the tissue specificity of substrate utilization by mitochondria (Table 3).  $V_{\text{substrate}}$  values for PC were higher in H animals, compared with both N and PF rats ( $P < 0.05$ ). This increased maximal respiration rate with PC was specifically due to hypoxia *per se*, independently of caloric restriction. Moreover,  $V_{\text{substrate}}$  for G3-P was higher in PF than in N group ( $P < 0.01$ ). This result indicates an increased oxidative capacity with G3-P fueling after prolonged caloric restriction.

Maximal PC oxidation represents nearly 50% of  $V_{\text{max}}$  in SOL whereas PC hardly reached 30% of  $V_{\text{max}}$  in EDL, consistent with the well-known tissue-specificity of high-oxidative muscles for fatty acid oxidation. Thus, in N animals, maximal Pyr oxidation reached  $V_{\text{max}}$  in SOL, and maximal G3-P use up to 57% in EDL. However, the respiration rates with markers of the aerobic glycolysis were higher than with PC, whatever the muscle type.

The sensitivity of mitochondrial respiration to the different substrates was estimated by  $K_m$  calculation (Table 3). Surprisingly,  $K_m$  values for PC were lower (and then sensitivity higher) in EDL than in SOL ( $P < 0.01$ ) under control normoxic condition. In SOL, apparent  $K_m$  values for PC were 30% lower in H than in N group ( $P < 0.01$ ), corresponding to increased sensitivity for PC as substrate (Table 3, Figure 1A). In the same way, a significant decrease in  $K_m$  values for PC was observed in EDL muscles from H rats in comparison not only with N group (46%,  $P < 0.001$ ), but also PF animals (32%,  $P < 0.05$ ) (Table 3, Figure 1B).  $K_m$  values for Pyr or G3-P, in SOL and EDL, respectively, remained unaffected by hypoxia or caloric restriction (Table 3).

## DISCUSSION

This study was the first to address the long-term effects of ambient hypoxia on the maximal utilization and sensitivity of mitochondrial respiration to specific substrates, using chemically skinned myofibers, a technique that allows measuring the whole mitochondrial mass and preserves the cytoskeleton-mitochondria interactions. The main results were that long-term exposure to ambient hypoxia led to qualitative changes in the mitochondrial function, occurring mainly in fast-glycolytic muscle. These adaptive responses concerned essentially the sensitivity and capacity to oxidize palmitoyl-carnitine, a long chain fatty acid coupled with carnitine which is transferred into the mitochondrial matrix through CPT-2. Moreover, caloric restriction led to increased utilization of G3-P in fast-twitch muscles and decreased utilization of pyruvate in slow-twitch muscles.

Our results show that muscle oxidative capacities measured by both maximal mitochondrial respiration and citrate synthase activity remained unaffected by hypoxia exposure. This finding is consistent with previous studies in animal models that failed to show any change in CS activity in skeletal muscles (6, 14, 16, 18). Taken together, these results confirm that prolonged hypoxia exposure did not affect markers of mitochondrial density, at least in sedentary rodents.

Hypoxia exposure increased the maximal respiration with palmitoyl carnitine as substrate. Because PC is transferred into the matrix through CPT-2, this finding is representative of the intrinsic ability of mitochondria to oxidize fatty acid independently of the CPT-1 activity. A previous study showed that prolonged exposure to hypoxia did not affect the maximal respiration rate with PC (18). Such discrepancy with our results remains unexplained, but in the present study, we used a technique that is known to maintain functionally intact the intracellular structures including mitochondria, and preserve the qualitative aspects of mitochondrial functions that are lost during isolation procedures (26).

This finding was representative of a qualitative response to hypoxia exposure, independently of mitochondrial mass. In contrast with the present results, a slight down-regulation of enzymes involved in energy production from fatty acids has been previously reported after either prolonged (16) or acute hypoxia exposure (15). However, the overall use of fatty acids as a metabolic fuel was substantially elevated in rodents exposed to high altitude (9, 35), a finding consistent with the present results reported for the first time in mitochondria maintained *in situ* within myofibers. Nevertheless, maximal fatty acid oxidation as assessed in this study only expresses a potentiality to use fatty acid *in vivo*, independently of CPT-1 activity.

Prolonged exposure to ambient hypoxia is associated with reduced food intake (45). Therefore, the mitochondrial adaptive responses to ambient hypoxia result from specific responses to several stresses including both hypoxia *per se* and decreased energy intake, a condition known to affect the energy metabolism. Determination of the stimuli at the origin of mitochondrial changes requires a clear separation between the influences of hypoxia and caloric restriction. The specific role played by hypoxia can be assessed comparing data collected in H rats to those measured in PF animals. Because the intrinsic ability of muscles to use PC as a fuel was not affected by caloric restriction alone, the increased respiration with PC observed in H rats was mainly related to hypoxia *per se*. Although we did not measure muscle oxygen pressure *in vivo* for technical reasons, a 30% decrease in oxygen pressure close to mitochondria is expected in resting muscle when barometric pressure is half control values (41). The permanent activation of the hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2), an important transcription factor for the cellular responses to hypoxia, has been shown to decrease glucose oxidation by 50%, whereas fatty acid oxidation remained at similar levels to those observed in skeletal muscle of control animals (3). Taken together, the metabolic responses to hypoxia

have been attributed to increased expression of PDK-1 (16), leading to PDH inactivation, and therefore limiting pyruvate oxidation (17).

In comparison with EDL, the maximal respiration with PC in SOL muscle was only slightly higher in H rats than in PF animals. Fast-glycolytic fibers are known to exhibit higher diffusion distances for oxygen between capillaries and mitochondria than slow-twitch fibers, a factor that could enhance the hypoxic stimulus (39). Therefore, the tissue-specificity of the response of fatty acid utilization to the hypoxic stimulus could be at least partly explained by differences in the intensity of the hypoxic stress within myofibers.

The increased sensitivity to specific substrate means that more oxygen is consumed by mitochondria, and then ATP produced, for a given submaximal substrate concentration. This functional property of mitochondria is fully complementary to maximal oxidation rate. The decreased  $K_m$  for palmytoyl-carnitine, and then increased sensitivity, observed in both oxidative and glycolytic skeletal muscles from H rats, in comparison with control N animals, may be interpreted as an enhanced capacity to transport PC within mitochondria and/or preferably oxidize PC when oxygen is not limiting. The effects of the hypoxic stimulus *per se* on the sensitivity to PC were more marked in EDL than in SOL muscles (31%,  $P < 0.05$ , versus 15%, *NS*, respectively). This could be also related to the intensity of the hypoxic stimulus within fast-twitch myofibers (39).

The increased maximal oxidation rate of PC, associated with decreased  $K_m$  for PC suggests specific qualitative adaptations, independently of any change in the mitochondrial density. Although the exact molecular mechanisms involved in sensibility for fatty acids remain to be elucidated, three different hypotheses may be considered. As recently reviewed, the level of the proton electrochemical gradient ( $\Delta\Psi$ ) is probably involved in the priority for electrons coming from either glucose or fatty acids, and then for substrate oxidation (23). Decreasing  $\Delta\Psi$  results in a progressive inhibition of respiration from glycolytic substrates,

confirming that low values of  $\Delta\Psi$  favor the fatty acid oxidation (44). This is one of the main mitochondrial determinants of high levels of fatty acid utilization in oxidative muscles under control conditions (27). The raise in mitochondrial UCP-3 content leads to decreased  $\Delta\Psi$  and enhanced acylCoA oxidation, with respect to glucose oxidation (19). Exposure to hypoxia is known to acutely increase the uncoupling-protein-3 (UCP-3) expression in skeletal muscle (30, 56), and then likely to reduce the proton electrochemical gradient. Therefore, the hypoxia-induced increase in UCP content would decrease the oxidative stress, protect mitochondria from damage and contribute to control the fatty acid oxidation in skeletal muscle (23). Moreover, because the binding of hexokinase to the outer mitochondrial membrane directly increases the glycolytic flux (28) and indirectly increases  $\Delta\Psi$  (48) then limiting fatty acid oxidation, the cellular distribution of this enzyme could also contribute to control the mitochondrial sensitivity for specific substrates. Finally, the supramolecular organization of the mitochondrial oxidative phosphorylation complexes could be involved in the control of substrate use (10). Respiratory complexes have been suggested to represent regulatory units of respiration and to be involved in the channeling of specific substrates (2). However, whether prolonged exposure to hypoxia *in vivo* affects the interaction of hexokinase with the outer mitochondrial membrane, or the respiratory supercomplex structure, remains largely unknown.

The slower body growth rate observed in H animals in comparison with N rats, associated with ~25% decrease in food consumption is consistent with the well-known response of rodents to ambient hypoxia (45). The lack of major change in muscle oxidative capacities after partial caloric restriction in normoxic rats, goes along with previous results (54). In comparison with N animals, the decrease in the maximal oxidation rate of pyruvate in SOL from PF rats is consistent with the well-described PDK activation and then PDH inhibition previously reported during fasting of short duration (52). Such responses have been

related to elevated free fatty acid concentration in plasma, as shown in the present study in PF rats, particularly in slow-twitch muscles (43, 53). Moreover, the increased oxidation rate of G3-P evidenced in EDL during caloric restriction was surprising, since it contrasts with the need of glycogen sparing. Nevertheless, this finding is consistent with previous data demonstrating that caloric restriction led to increased glucose uptake (8, 51) and in parallel, to an inhibition of PDH (52). Finally, taken together our results show a clear tissue-specificity in the muscle response to caloric restriction, regarding markers of glycolytic flux and glucose oxidation (8).

In conclusion, our results for the first time, show that the hypoxic stimulus affects the sensitivity of mitochondrial respiration to palmitoyl carnitine. The ability to oxidize more and preferably long-chain fatty acids, conveys a potentiality to use fatty acid *in vivo*, independently of molecular events involved in the control of sarcolemmal and mitochondrial transports. This finding highlights qualitative mitochondrial adaptations that occurred regardless alterations in mitochondrial density. The exact intramitochondrial molecular mechanisms responsible for fuel preference remain to clarify in further studies. Regarding the tissue-specificity of the response of locomotor muscles to ambient hypoxia, it could be interesting to study in the future the responses of muscles chronically active, in a situation of energetic challenge when oxygen availability is affected, such as the diaphragm and heart.

## REFERENCES

1. **Abdelmalki A, Fimbel S, Mayet-Sornay MH, Sempore B, and Favier R.** Aerobic capacity and skeletal muscle properties of normoxic and hypoxic rats in response to training. *Pflugers Arch* 431: 671-679, 1996.
2. **Acin-Perez R, Fernandez-Silva P, Peleato ML, Perez-Martos A, and Enriquez JA.** Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 32: 529-539, 2008.
3. **Aragones J, Schneider M, Van Geyte K, Fraisl P, Dresselaers T, Mazzone M, Dirckx R, Zacchigna S, Lemieux H, Jeoung NH, Lambrechts D, Bishop T, Lafuste P, Diez-Juan A, Harten SK, Van Noten P, De Bock K, Willam C, Tjwa M, Grosfeld A, Navet R, Moons L, Vandendriessche T, Deroose C, Wijeyekoon B, Nuyts J, Jordan B, Silasi-Mansat R, Lupu F, Dewerchin M, Pugh C, Salmon P, Mortelmans L, Gallez B, Gorus F, Buyse J, Sluse F, Harris RA, Gnaiger E, Hespel P, Van Hecke P, Schuit F, Van Veldhoven P, Ratcliffe P, Baes M, Maxwell P, and Carmeliet P.** Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat Genet* 40: 170-180, 2008.
4. **Bahi L, Koulmann N, Sanchez H, Momken I, Veksler V, Bigard AX, and Ventura-Clapier R.** Does ACE inhibition enhance endurance performance and muscle energy metabolism in rats? *J Appl Physiol* 96: 59-64, 2004.
5. **Barazzoni R, Zanetti M, Bosutti A, Biolo G, Vitali-Serdoz L, Stebel M, and Guarnieri G.** Moderate caloric restriction, but not physiological hyperleptinemia per se, enhances mitochondrial oxidative capacity in rat liver and skeletal muscle--tissue-specific impact on tissue triglyceride content and AKT activation. *Endocrinology* 146: 2098-2106, 2005.
6. **Bigard AX, Brunet A, Guezennec CY, and Monod H.** Skeletal muscle changes after endurance training at high altitude. *J Appl Physiol* 71: 2114-2121, 1991.
7. **Bigard AX, Douce P, Merino D, Lienhard F, and Guezennec CY.** Changes in dietary protein intake fail to prevent decrease in muscle growth induced by severe hypoxia in rats. *J Appl Physiol* 80: 208-215, 1996.
8. **Bissonnette DJ, and Jeejeebhoy KN.** Feeding a low energy diet and refeeding a control diet affect glycolysis differently in the slow- and fast-twitch muscles of adult male Wistar rats. *J Nutr* 128: 1723-1730, 1998.
9. **Blume FD, and Pace N.** Effect of translocation to 3,800 m altitude on glycolysis in mice. *J Appl Physiol* 23: 75-79, 1967.
10. **Boekema EJ, and Braun HP.** Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem* 282: 1-4, 2007.
11. **Braun B, Mawson JT, Muza SR, Dominick SB, Brooks GA, Horning MA, Rock PB, Moore LG, Mazzeo RS, Ezeji-Okoye SC, and Butterfield GE.** Women at altitude: carbohydrate utilization during exercise at 4,300 m. *J Appl Physiol* 88: 246-256, 2000.
12. **Brooks GA, Butterfield GE, Wolfe RR, Groves BM, Mazzeo RS, Sutton JR, Wolfel EE, and Reeves JT.** Increased dependence on blood glucose after acclimatization to 4,300 m. *J Appl Physiol* 70: 919-927, 1991.
13. **Chabowski A, Gorski J, Calles-Escandon J, Tandon NN, and Bonen A.** Hypoxia-induced fatty acid transporter translocation increases fatty acid transport and contributes to lipid accumulation in the heart. *FEBS Lett* 580: 3617-3623, 2006.
14. **Daneshraz Z, Garcia-Riera MP, Verdys M, and Rossi A.** Differential responses to chronic hypoxia and dietary restriction of aerobic capacity and enzyme levels in the rat myocardium. *Mol Cell Biochem* 210: 159-166, 2000.
15. **Dapp C, Gassmann M, Hoppeler H, and Fluck M.** Hypoxia-induced gene activity in disused oxidative muscle. *Adv Exp Med Biol* 588: 171-188, 2006.
16. **De Palma S, Ripamonti M, Vigano A, Moriggi M, Capitanio D, Samaja M, Milano G, Cerretelli P, Wait R, and Gelfi C.** Metabolic modulation induced by chronic hypoxia in rats using a comparative proteomic analysis of skeletal muscle tissue. *J Proteome Res* 6: 1974-1984, 2007.
17. **Formenti F, Constantin-Teodosiu D, Emmanuel Y, Cheeseman J, Dorrington KL, Edwards LM, Humphreys SM, Lappin TR, McMullin MF, McNamara CJ, Mills W, Murphy JA, O'Connor DF, Percy MJ, Ratcliffe PJ, Smith TG, Treacy M, Frayn KN, Greenhaff PL, Karpe F, Clarke K, and Robbins PA.** Regulation of human metabolism by hypoxia-inducible factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 12722-12727, 2010.
18. **Galbes O, Goret L, Caillaud C, Mercier J, Obert P, Candau R, and Py G.** Combined effects of hypoxia and endurance training on lipid metabolism in rat skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)* 193: 163-173, 2008.
19. **Garcia-Martinez C, Sibille B, Solanes G, Darimont C, Mace K, Villarroya F, and Gomez-Foix AM.** Overexpression of UCP3 in cultured human muscle lowers mitochondrial membrane potential, raises ATP/ADP ratio, and favors fatty acid vs. glucose oxidation. *FASEB J* 15: 2033-2035, 2001.

20. **Green HJ, Sutton J, Young P, Cymerman A, and Houston CS.** Operation Everest II: muscle energetics during maximal exhaustive exercise. *J Appl Physiol* 66: 142-150, 1989.
21. **Green HJ, Sutton JR, Cymerman A, Young PM, and Houston CS.** Operation Everest II: adaptations in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 66: 2454-2461, 1989.
22. **Hoppeler H, and Fluck M.** Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. *Med Sci Sports Exerc* 35: 95-104, 2003.
23. **Hue L, and Taegtmeyer H.** The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E578-591, 2009.
24. **Kennedy SL, Stanley WC, Panchal AR, and Mazzeo RS.** Alterations in enzymes involved in fat metabolism after acute and chronic altitude exposure. *J Appl Physiol* 90: 17-22, 2001.
25. **Kuznetsov AV, Tiivel T, Sikk P, Kaambre T, Kay L, Daneshrad Z, Rossi A, Kadaja L, Peet N, Seppet E, and Saks VA.** Striking differences between the kinetics of regulation of respiration by ADP in slow-twitch and fast-twitch muscles in vivo. *Eur J Biochem* 241: 909-915, 1996.
26. **Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, and Kunz WS.** Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 3: 965-976, 2008.
27. **Leary SC, Lyons CN, Rosenberger AG, Ballantyne JS, Stillman J, and Moyes CD.** Fiber-type differences in muscle mitochondrial profiles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R817-826, 2003.
28. **Leverve XM.** Mitochondrial function and substrate availability. *Crit Care Med* 35: S454-460, 2007.
29. **Lowry O, and Passonneau J.** *A flexible system of enzymatic analysis.* Academic Press (NY) 1972.
30. **Lu Z, and Sack MN.** ATF-1 is a hypoxia-responsive transcriptional activator of skeletal muscle mitochondrial-uncoupling protein 3. *J Biol Chem* 283: 23410-23418, 2008.
31. **Lundby C, and Van Hall G.** Substrate utilization in sea level residents during exercise in acute hypoxia and after 4 weeks of acclimatization to 4100 m. *Acta Physiol Scand* 176: 195-201, 2002.
32. **McClelland GB, Hochachka PW, Reidy SP, and Weber JM.** High-altitude acclimation increases the triacylglycerol/fatty acid cycle at rest and during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E537-544, 2001.
33. **McClelland GB, Hochachka PW, and Weber JM.** Effect of high-altitude acclimation on NEFA turnover and lipid utilization during exercise in rats. *Am J Physiol* 277: E1095-1102, 1999.
34. **Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, and Carruba MO.** Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 310: 314-317, 2005.
35. **Ou LC, and Leiter JC.** Effects of exposure to a simulated altitude of 5500 m on energy metabolic pathways in rats. *Respir Physiol Neurobiol* 141: 59-71, 2004.
36. **Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, and Denko NC.** HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 3: 187-197, 2006.
37. **Perhonen M, Takala TE, and Kovanen V.** Effects of prolonged exposure to and physical training in hypobaric conditions on skeletal muscle morphology and metabolic enzymes in rats. *Pflugers Arch* 423: 50-58, 1996.
38. **Peronnet F, Massicotte D, Folch N, Melin B, Koulmann N, Jimenez C, Bourdon L, Launay JC, and Savourey G.** Substrate utilization during prolonged exercise with ingestion of (13)C-glucose in acute hypobaric hypoxia (4,300 m). *Eur J Appl Physiol* 97: 527-534, 2006.
39. **Pisani DF, and Dechesne CA.** Skeletal muscle HIF-1 $\alpha$  expression is dependent on muscle fiber type. *J Gen Physiol* 126: 173-178, 2005.
40. **Ponsot E, Zoll J, N'Guessan B, Ribera F, Lampert E, Richard R, Veksler V, Ventura-Clapier R, and Mettauer B.** Mitochondrial tissue specificity of substrates utilization in rat cardiac and skeletal muscles. *J Cell Physiol* 203: 479-486, 2005.
41. **Richardson RS, Duteil S, Wary C, Wray DW, Hoff J, and Carlier PG.** Human skeletal muscle intracellular oxygenation: the impact of ambient oxygen availability. *J Physiol* 571: 415-424, 2006.
42. **Roberts AC, Butterfield GE, Cymerman A, Reeves JT, Wolfel EE, and Brooks GA.** Acclimatization to 4,300-m altitude decreases reliance on fat as a substrate. *J Appl Physiol* 81: 1762-1771, 1996.
43. **Samec S, Seydoux J, and Dulloo AG.** Interorgan signaling between adipose tissue metabolism and skeletal muscle uncoupling protein homologs: is there a role for circulating free fatty acids? *Diabetes* 47: 1693-1698, 1998.
44. **Sibille B, Filippi C, Piquet MA, Leclercq P, Fontaine E, Ronot X, Rigoulet M, and Leverve X.** The mitochondrial consequences of uncoupling intact cells depend on the nature of the exogenous substrate. *Biochem J* 355: 231-235, 2001.
45. **Simler N, Malgoyre A, Koulmann N, Alonso A, Peinnequin A, and Bigard AX.** Hypoxic stimulus alters hypothalamic AMP-activated protein kinase phosphorylation concomitant to hypophagia. *J Appl Physiol* 102: 2135-2141, 2007.
46. **Srere P.** Citrate synthase. In: *Methods in Enzymology.* London: Academic Press 1969.

47. **Sugden MC, and Holness MJ.** Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am J Phys Endocrinol Metab* 284: E855-862, 2003.
48. **Sutendra G, Bonnet S, Rochefort G, Haromy A, Folmes KD, Lopaschuk GD, Dyck JR, and Michelakis ED.** Fatty acid oxidation and malonyl-CoA decarboxylase in the vascular remodeling of pulmonary hypertension. *Sci Transl Med* 2: 44ra58, 2010.
49. **Veksler VI, Kuznetsov AV, Anflous K, Mateo P, van Deursen J, Wieringa B, and Ventura-Clapier R.** Muscle creatine kinase-deficient mice. II. Cardiac and skeletal muscles exhibit tissue-specific adaptation of the mitochondrial function. *J Biol Chem* 270: 19921-19929, 1995.
50. **Ventura-Clapier R, Kuznetsov A, Veksler V, Boehm E, and Anflous K.** Functional coupling of creatine kinases in muscles: species and tissue specificity. *Mol Cell Biochem* 184: 231-247, 1998.
51. **Wetter TJ, Gazdag AC, Dean DJ, and Cartee GD.** Effect of calorie restriction on in vivo glucose metabolism by individual tissues in rats. *Am J Phys Endocrinol Metab* 276: E728-738, 1999.
52. **Wu P, Blair PV, Sato J, Jaskiewicz J, Popov KM, and Harris RA.** Starvation increases the amount of pyruvate dehydrogenase kinase in several mammalian tissues. *Arch Biochem Biophys* 381: 1-7, 2000.
53. **Wu P, Peters JM, and Harris RA.** Adaptive increase in pyruvate dehydrogenase kinase 4 during starvation is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 391-396, 2001.
54. **You YN, Short KR, Jourdan M, Klaus KA, Walrand S, and Nair KS.** The effect of high glucocorticoid administration and food restriction on rodent skeletal muscle mitochondrial function and protein metabolism. *PLoS One* 4: e5283, 2009.
55. **Young AJ, Evans WJ, Cymerman A, Pandolf KB, Knapik JJ, and Maher JT.** Sparing effect of chronic high-altitude exposure on muscle glycogen utilization. *J Appl Physiol* 52: 857-862, 1982.
56. **Zhou M, Lin BZ, Coughlin S, Vallega G, and Pilch PF.** UCP-3 expression in skeletal muscle: effects of exercise, hypoxia, and AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E622-629, 2000.

**ACKNOWLEDGMENTS**

We thank collectively R.Ventura-Clapier and V. Veksler for expert assistance in studying substrate use with permeabilized fibers and also for many inspiring discussions. A.Malgoyre thanks personally B.Serrurier for learning enzyme activities assays and his helpful technical advices.

**LEGEND**

**Figure 1:** Representative experiments of oxygen consumption as a function of palmitoyl-carnitine concentration for soleus (A) and extensor digitorum longus muscles (B). Lines are non linear fitting of data to the Mickaelis-Menten equation.

**Table 1.** Morphological and biochemical plasma values.

	N	H	PF
Body weight (BW) (g)	388 ± 12	320 ± 17 **	309 ± 4 **
Delta body weight (g)	83 ± 9	24 ± 6 ***	14 ± 9 ***
Retroperitoneal fat mass <sup>1</sup> (g)	1.08 ± 0.14	0.72 ± 0.06 *	0.88 ± 0.11
Plasma free fatty acid (μmol/L)	74.4 ± 8.9	72.5 ± 7.1\$	156.7 ± 32.5**
Hematocrit (%)	46.8 ± 0.5	61.3 ± 1.3** \$\$	45.9 ± 1.5

Data are expressed as mean ± SE.

<sup>1</sup> expressed in grams per 100g body weight

Statistically different from N group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ . Statistically different from PF group, \$  $P < 0.05$ , \$\$  $P < 0.01$ .

**Table 2.** Muscle maximal oxidative capacities (Vmax), citrate synthase (CS) and 3-hydroxyl-acyl coenzyme A dehydrogenase (3-HAD) activities, in soleus (SOL) and extensor digitorum longus (EDL) muscles.

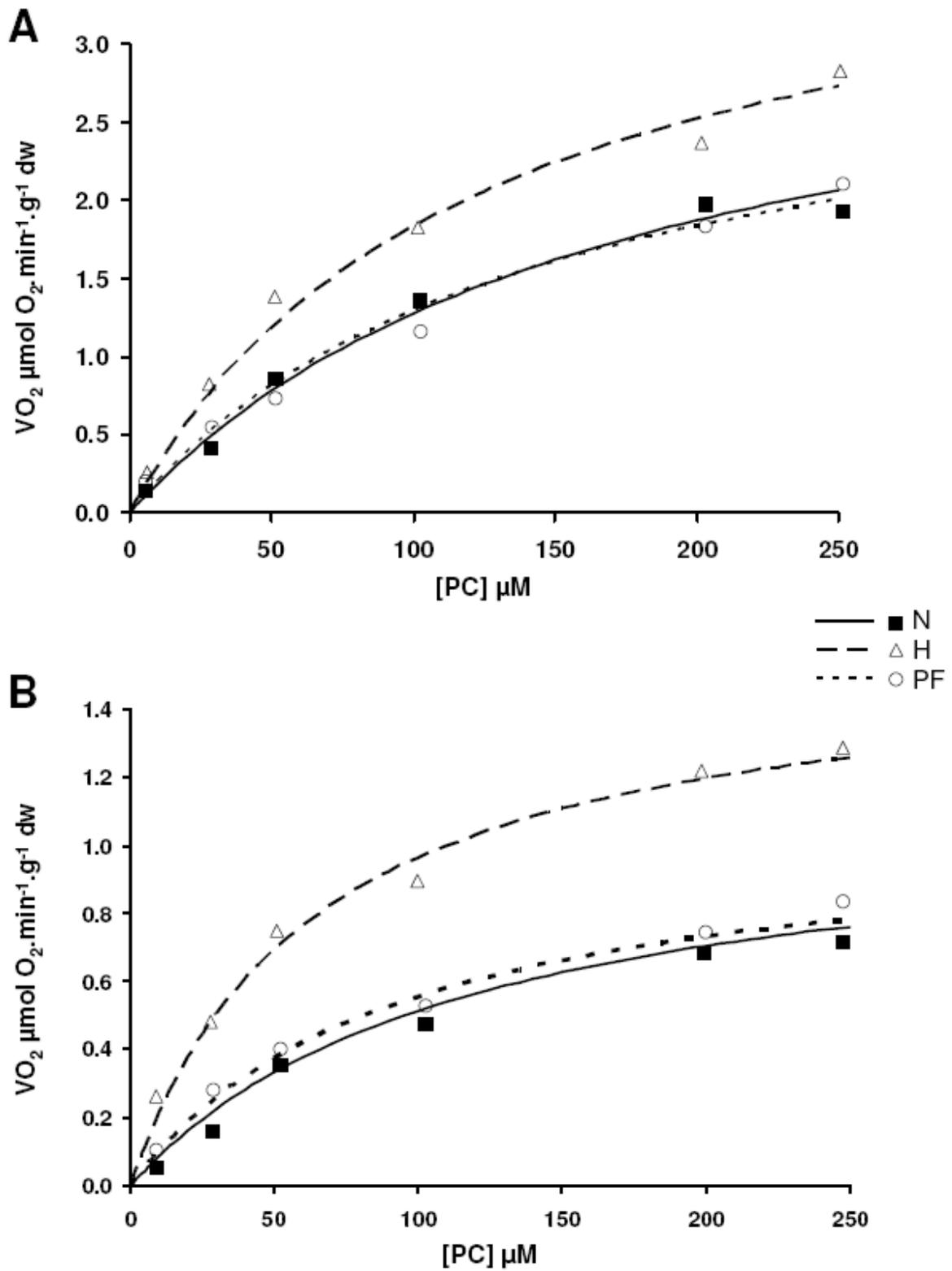
	N			H			PF		
	Vmax	CS	3-HAD	Vmax	CS	3-HAD	Vmax	CS	3-HAD
<b>SOL</b>	6.8 ± 0.3	37.8 ± 1.5	3.1 ± 0.2	6.4 ± 0.3	37.9 ± 3.1	3.0 ± 0.4	6.4 ± 0.2	31.4 ± 1.6	3.2 ± 0.3
<b>EDL</b>	5.4 ± 0.2	28.0 ± 2.5	1.3 ± 0.8	5.1 ± 0.1	27.7 ± 1.5	1.2 ± 0.1	5.2 ± 0.1	27.8 ± 0.5	1.3 ± 0.1

Data are means ± SE. Vmax values are expressed as  $\mu\text{mole O}_2/\text{min/g dw}$ , and enzymatic activities as  $\text{UI}\cdot\text{g}^{-1}\text{ wt}$ .

**Table 3.** Maximal oxygen consumption ( $V_{\text{substrate}}$ ) and mitochondrial sensitivity ( $1/K_m$ ) measured with pyruvate (Pyr), palmitoyl DL-carnitine (PC) and Glycerol-3-phosphate (G3-P) as substrates, in both SOL and EDL muscles.

	N		H		PF	
	$V_{\text{substrate}}$	$K_m$	$V_{\text{substrate}}$	$K_m$	$V_{\text{substrate}}$	$K_m$
<b>SOL</b>						
Pyr	$6.9 \pm 0.3$	$551 \pm 39$	$6.6 \pm 0.4$	$493 \pm 35$	$6.0 \pm 0.1^*$	$536 \pm 33$
PC	$3.3 \pm 0.2$	$175 \pm 16$	$3.7 \pm 0.2^{**}$	$122 \pm 8^*$	$3.0 \pm 0.2$	$144 \pm 12$
<b>EDL</b>						
G3-P	$3.1 \pm 0.2$	$1562 \pm 151$	$3.3 \pm 0.1$	$1629 \pm 110$	$3.7 \pm 0.2^{**}$	$1359 \pm 89$
PC	$1.5 \pm 0.1$	$118 \pm 11$	$1.9 \pm 0.2^{*\$}$	$64 \pm 8^{***\$}$	$1.5 \pm 0.1$	$93 \pm 10$

$V_{\text{substrate}}$  values are expressed as  $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  dry wt.  $K_m$  values are expressed as  $\mu\text{M}$ . 2-3 experiments have been done for each condition, in each of the 8 animals per group. Data are expressed as mean  $\pm$  SE. Significantly different from N animals, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Significantly different from PF animals, \$  $P < 0.05$ , \$\$  $P < 0.01$ .



---

## **Etude 2 : cinétique des réponses transcriptionnelles au cours d'une exposition aiguë à l'hypoxie**

### **I. Justification du travail**

Il existe très peu d'études s'intéressant aux modulations transcriptionnelles aiguës dans le muscle squelettique lors d'une exposition à l'hypoxie, et aucune ne prend en compte les effets de la restriction calorique ou encore d'une spécificité liée au phénotype musculaire (Dapp, et coll., 2006, De Palma, et coll., 2007, Vigano, et coll., 2008). D'autre part, ces études ne sont réalisées qu'à un temps final, alors que nous nous proposons d'étudier la cinétique de la réponse transcriptionnelle au cours de l'exposition à l'hypoxie. Par ailleurs, les preuves de l'existence d'une hypoxie tissulaire (au niveau musculaire) consécutive à une hypoxie environnementale sur un organisme au repos manquent encore. Enfin, l'augmentation surprenante de l'affinité pour le palmitoyl carnitine montrée lors de l'étude n°1, nous a conduit à réfléchir sur l'origine d'une telle adaptation et le rôle que pouvaient avoir les voies de signalisations impliquant la famille des PPARs.

### **II. Objectifs**

Les conséquences du stimulus hypoxique dans les muscles squelettiques EDL et soléaire seront étudiées au cours d'une exposition aiguë à l'hypoxie.

Nous étudierons également, le niveau d'activation précoce de la voie des PPARs, et de ses cibles impliquées dans le métabolisme des AG, et pouvant participer à la mise en place des adaptations mitochondriales observées à l'issue d'une exposition chronique à l'hypoxie (étude n°1). Comme précédemment évoqué, la restriction calorique est une condition bien connue stimulant la voie PPAR, nous nous attacherons donc à isoler la part de la réponse liée au stimulus hypoxique *per se*, de celle liée à la restriction calorique.

### III. Plan expérimental

Pour cela, nous proposons une approche descriptive des modulations transcriptionnelles induites d'une part, par le stimulus hypoxique et d'autre part, par la voie des PPARs dans les groupes d'animaux suivants (rats mâles Wistar d'environ 250-300g) avec n=8 animaux par groupe expérimental :

- normoxiques *ad libitum* (N)
- hypoxiques (H), exposés à une altitude simulée de 5500m
- normoxiques *pairfed* (PF), dont la prise alimentaire est identique à celle des animaux hypoxiques.

Ces trois groupes sont étudiés à différents temps de conditionnement : 6 heures, 24 heures ou 7 jours après la mise en condition.

Compte tenu de la labilité du facteur de transcription Hif-1, dont la demi-vie est inférieure à 5 minutes, nous avons pris soin de sacrifier les animaux dans leur condition environnementale pour prélever les muscles EDL et soléaire. Ensuite l'extraction des ARN totaux, l'étape de « reverse transcription » des ARN messager en ADN complémentaire, et la PCR en temps réelle ont été réalisées selon les modalités décrites dans les matériels et méthodes.

En l'absence de différence significative entre les groupes contrôles aux différents temps ceux-ci ont été regroupés pour constituer un groupe contrôle commun, dit de « référence » et pour lequel la quantification des messagers a été mise arbitrairement à 1. L'expression des messagers des autres groupes est exprimée en fonction du groupe référence.

L'analyse statistique est une analyse de variance à 2 voies avec un effet « condition » (hypoxie ou restriction calorique), et effet « temps » (6h, 24h, 7j). Les comparaisons deux à deux pertinentes, ont été réalisées avec un test de Neuman-Keuls.

## IV. Résultats

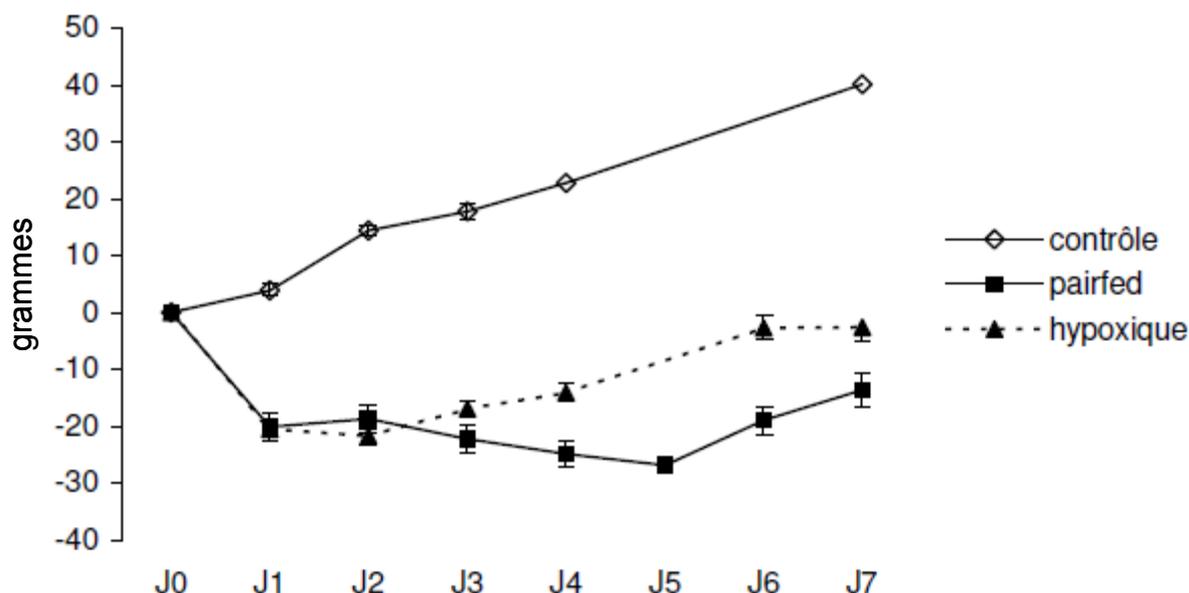
### A. Données morphométriques : prise alimentaire et poids des animaux

Alors qu'à sept semaines de vie, les rats mâles sont des animaux encore en croissance, on observe une perte de poids chez les hypoxiques et les *pair-fed* au cours du conditionnement (Figure 35). Cette perte de poids est majeure durant les 24 premières heures, d'environ 20 g en moyenne dans les deux conditions. Dès le deuxième jour, les rats hypoxiques ont stabilisé leur poids et reprennent une croissance pondérale similaire à celle d'animaux contrôles à partir du troisième jour, tandis que les *pair-fed* continuent à perdre du poids jusqu'au cinquième jour, gardant, après sept jours d'hypoxie, un poids significativement inférieur à leur poids initial (-5%,  $p < 0,01$ ) ; à ce délai, les animaux hypoxiques ont retrouvé leur poids de départ.

Le passage en hypoxie s'accompagne d'une réduction spontanée et importante de la prise alimentaire, durant les 24 premières heures (-75%) et qui se corrige progressivement durant la première semaine d'hypoxie pour se stabiliser par la suite. A sept jours, la prise alimentaire n'est plus significativement différente du groupe contrôle même s'il perdure une diminution d'environ 15 % par rapport aux animaux *ad libitum* (Tableau 2).

	J0 à J1	J1 à J2	J2 à J3	J3 à J4	J4 à J5	J5 à J6	J6 à J7	contrôle
Prise alimentaire quotidienne en grammes (esm)	7,12(±0,8)	14,25(±0,9)	13,87(±0,6)	15,75(±1,9)	19,62(±0,4)	19,62(±0,4)	23,5(±0,7)	27
% de la prise alimentaire des contrôles	27%	52%	52%	59%	70%	72%	87%	100%
Prise alimentaire/ 100 g de poids	3,01(±0,3)	6,0(±0,4)	5,78(±0,23)	6,57(±0,78)	7,72(±0,15)	7,95(±0,21)	9,26(±0,26)	10,04(±0,1)

**Tableau 2** : évolution de la prise alimentaire quotidienne moyenne des rats en hypoxie. En valeur absolue, exprimée en pourcentage de la prise alimentaire des contrôles et rapportée à leur poids corporel. *Valeurs sous forme de moyenne ± esm.*



**Figure 35** : évolution quotidienne du poids par rapport au poids initial.

*Valeurs sous forme de moyenne  $\pm$  esm.*

## B. Biochimie plasmatique

### 1. Les marqueurs de la lipolyse

Dès 6 heures, il existe une lipolyse importante avec une élévation conjointe des AGL et du glycérol plasmatique (tableau 3), tant chez les animaux *pairfed* que chez les hypoxiques (respectivement multipliés par 2,4  $P < 0,01$  et 2,8  $P < 0,001$ ).

A 24 heures, cette augmentation se poursuit encore mais avec un effet plus marqué chez les *pairfed* que chez les hypoxiques (respectivement x 4 chez les *pairfed* vs x 3 chez les hypoxiques pour le glycérol et x 3,2 chez *pairfed* vs 2,8 chez les hypoxiques pour les AGL,  $P < 0,01$ ).

A sept jours, bien que les AGL restent significativement élevés chez les hypoxiques (x 2,  $P < 0,01$ ) alors que l'élévation n'est plus significative chez les *pairfed* (x 1,4, NS), il n'existe pas de différence significative entre animaux *pairfed* et hypoxiques. De plus, le glycérol confirme un niveau de lipolyse comparable dans ces deux groupes par rapport aux

normoxiques *ad libitum* (respectivement x 3,2,  $P < 0,001$  pour les hypoxiques et x 2,5,  $P < 0,001$  pour les *pairfed*).

## 2. Glycémie et insulïnémie

Après 6 heures de conditionnement, la glycémie s'élève chez les animaux hypoxiques (+ 18%,  $P < 0,01$ ) mais sans réponse insulïnique associée (tableau 3). Alors que la glycémie des *pairfed* s'effondre après 24 heures (-27 %,  $P < 0,001$ ), la glycémie des hypoxiques ne fait que se normaliser, restant significativement plus élevée que chez les animaux *pairfed* (+ 28%,  $P < 0,001$ ). A 24 heures, l'insulïnémie est divisée par quatre chez les *pair-fed* ( $p < 0,001$ ) mais seulement par deux chez les hypoxiques ( $p < 0,05$ ) en cohérence avec leur niveau respectif de glycémie.

Au cours du temps, les glycémies des *pairfed* et des hypoxiques se normalisent même si la glycémie moyenne des hypoxiques se trouve dans la limite inférieure des valeurs normales chez le rongeur. A sept jours, les insulïnémies des rats *pairfed* et des hypoxiques sont comparables, mais encore abaissées avec des valeurs pratiquement moitié des valeurs contrôles (- 48%,  $P < 0,05$  chez les H, -35%, NS chez les *pairfed*).

	Normoxiques <i>ad libitum</i>			Hypoxiques			Normoxiques <i>pair fed</i>		
	6h	24h	7j	6h	24h	7j	6h	24h	7j
AGL (µM)	144±16	134±18	182±16	353±58 **	410±36 *** \$\$	382±35 **	348±57 **	585±35 *** \$\$\$	252±37
Glycérol (µM)	44±14	58±13	38±7	126±13 ***	161±13 *** §	122±6 ***	144±10 ***	186±2 *** \$\$	95±9 *** \$\$
Glycémie (mM)	9,7±0,2	9,6±0,4	9,4±0,3	11,5±0,9 *** \$\$\$	8,9±0,3 \$\$\$	8,2±0,3	9,6±0,2	7,0±0,2 *** \$\$	8,9±0,3
Insulïnémie (µUI/ml)	105±12	99±11	88±9	79±18	51±5 *	45±9 *	52±5 **	26±6 ***	57±7

**Tableau 3** : biochimie plasmatique. Valeurs sous forme de moyenne ± esm.

Différents des normoxiques *ad libitum* \*\*\*  $P < 0,001$  \*\*  $P < 0,01$  \*  $P < 0,05$

Différents des normoxiques *pairfed* du même temps \$\$\$  $P < 0,001$  \$\$  $P < 0,01$  \$  $P < 0,05$

Différents des autres temps de la même condition §§§  $P < 0,001$  §§  $P < 0,01$  §  $P < 0,05$

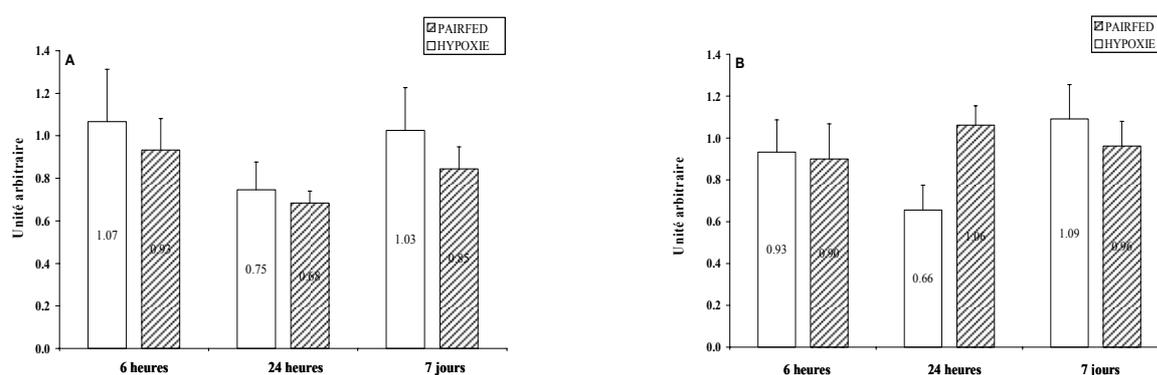
### C. Expression transcriptionnelle dans l'EDL et le soléaire

#### 1. Voie de l'oxydation des AG : transcription des PPARs et de leurs gènes cibles

##### 1.1 PPARs et leur cofacteur PGC-1 $\alpha$

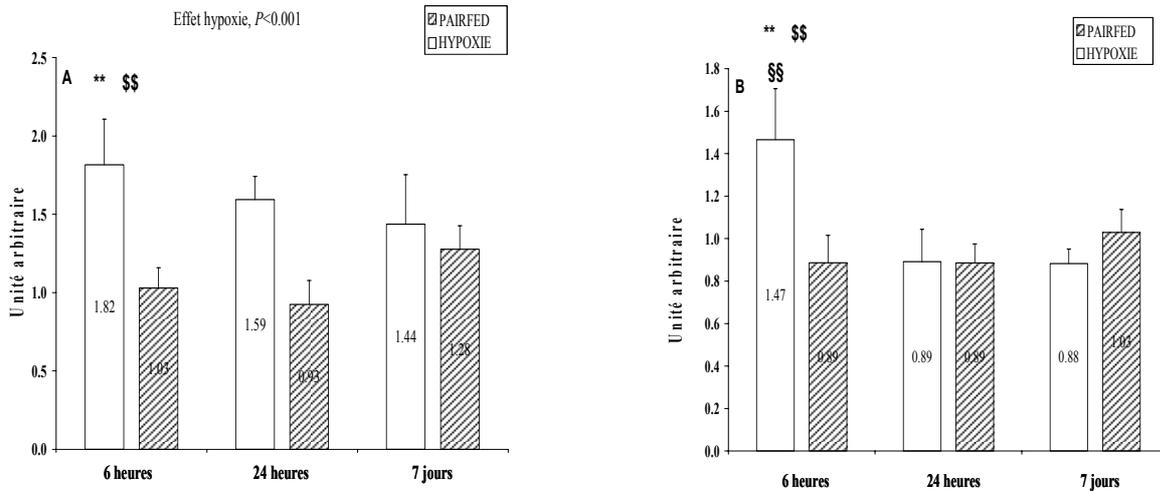
La quantité de transcrits PPAR- $\alpha$  n'est modifiée ni dans l'EDL ni dans le SOL, dans aucune des conditions ni temps expérimentaux (Figure 36). Par contre, PPAR- $\delta$  est induit précocement et spécifiquement à l'hypoxie dans les deux muscles (Figure 37). Cet effet ne persiste pas au cours du temps, même s'il s'amoindrit moins dans le SOL que dans l'EDL (effet global hypoxie,  $P < 0,001$ ).

Les mêmes observations sont faites pour PGC-1 $\alpha$  qui augmente à 6 heures lors de l'exposition à l'hypoxie aussi bien dans l'EDL que dans le SOL sans modification dans le groupe apparié en prise alimentaire (Figure 38). Alors que l'effet persiste encore à 24 heures dans l'EDL, on observe un retour à l'état basal à sept jours dans les deux muscles. Par contre, alors que dans le SOL l'expression de PGC-1 $\alpha$  est augmentée d'une fois et demie dans le groupe *pairfed* à sept jours, cette augmentation n'est pas retrouvée dans le groupe d'animaux hypoxiques. Ainsi, concernant l'expression de PGC-1 $\alpha$ , il apparaît au cours du temps un effet propre de la restriction calorique freiné par l'exposition simultanée à l'hypoxie dans le SOL.



**Figure 36** : quantification relative des ARNm PPAR- $\alpha$  dans l'EDL (A) et le soléaire (B).

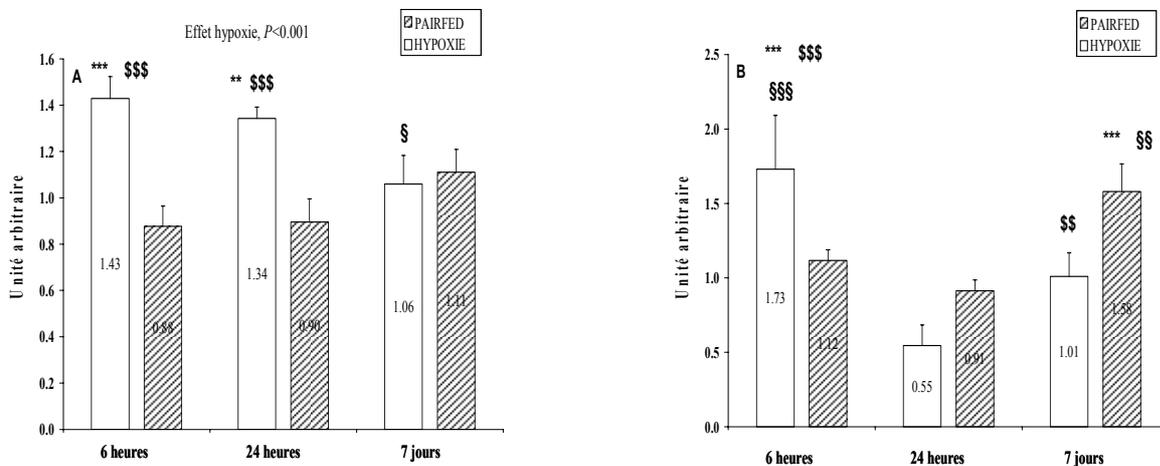
Les résultats sont exprimés en proportion du groupe normoxique ad libitum, moyenne  $\pm$  esm



**Figure 37 :** quantification relative des ARNm PPAR- $\delta$  dans l'EDL (A) et le soléaire (B).

Les résultats sont exprimés en proportion du groupe normoxique ad libitum, moyenne  $\pm$  esm

Différents des normoxiques ad libitum \*\*  $P < 0,01$  - Différents des normoxiques pairfed du même temps \$\$  $P < 0,01$  - Différents des autres temps de la même condition \$\$\$  $P < 0,01$



**Figure 38 :** quantification relative des ARNm PGC1- $\alpha$  dans l'EDL (A) et le soléaire (B).

Les résultats sont exprimés en proportion du groupe normoxique ad libitum, moyenne  $\pm$  esm

Différents des normoxiques ad libitum \*\*\*  $P < 0,001$  \*\*  $P < 0,01$  - Différents des normoxiques pairfed du même temps \$\$\$  $P < 0,001$  \$\$  $P < 0,01$  - Différents des autres temps de la même condition \$\$\$  $P < 0,001$  \$\$\$  $P < 0,01$  §  $P < 0,05$

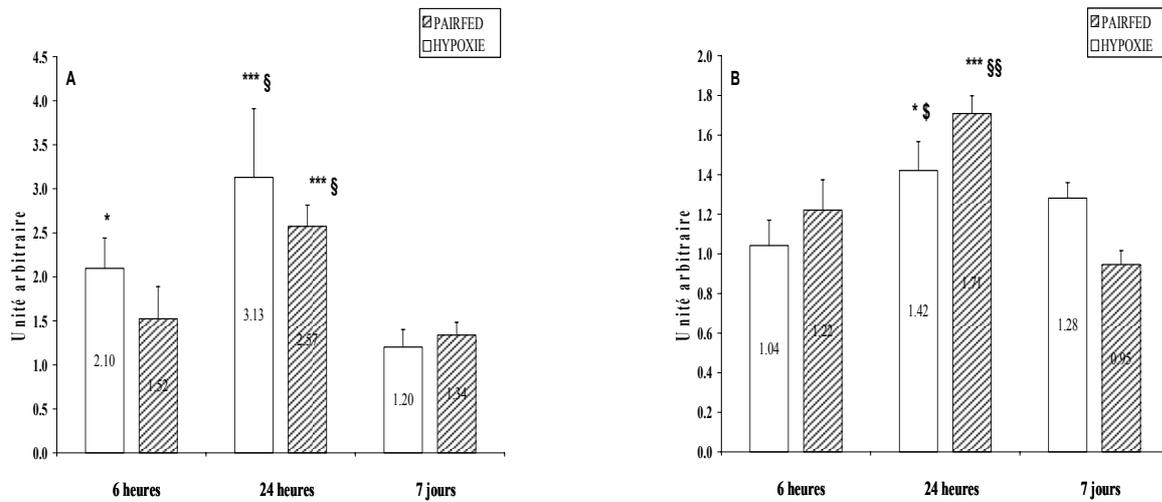
---

L'ensemble des gènes présentés par la suite l'est à double titre puisqu'ils sont non seulement impliqués dans le métabolisme des AG mais ils sont aussi des cibles transcriptionnelles de PPAR- $\delta$ :

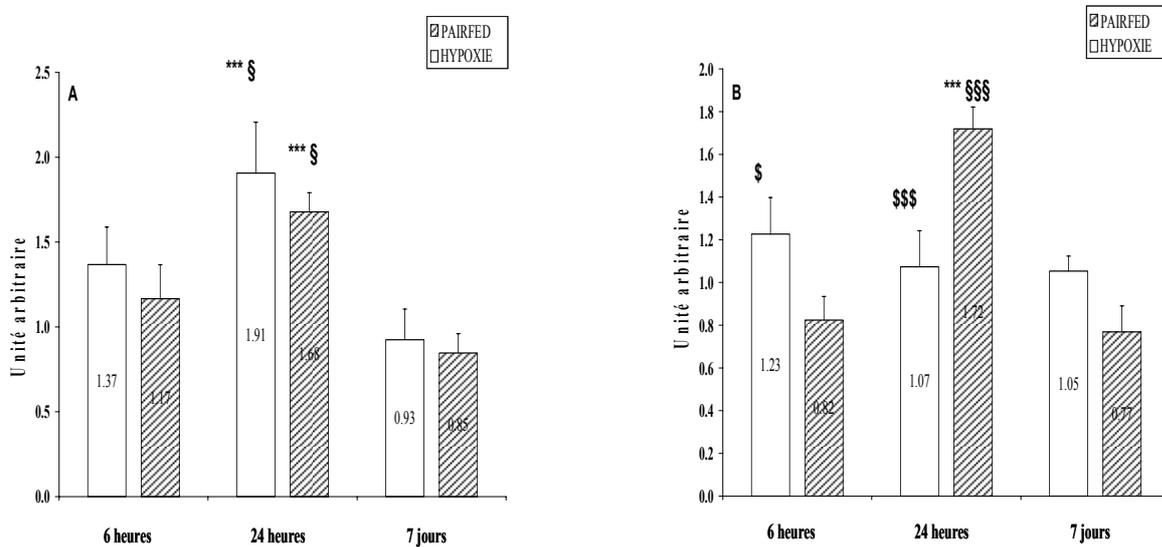
- les transporteurs membranaires des AG : FABP-3 (Dressel, et coll., 2003, Kramer, et coll., 2007) et Fat CD36 (Nahle, et coll., 2008)
- le transport CPT-1 et sa régulation : CPT-1b (Dressel, et coll., 2003) et MCD (Campbell, et coll., 2002)
- le flux de pyruvate dans la mitochondrie : PDK-4 (Constantin, et coll., 2007, Degenhardt, et coll., 2007, Kramer, et coll., 2007)
- l'oxydation mitochondriale des AG : MCAD (Gulick, et coll., 1994)

### 1.2 Transport membranaire des AG

Pour les deux transporteurs membranaires, Fat CD36 et FABP-3, il existe une induction de transcription nette à 24 heures de conditionnement tant chez les *pairfed* que chez les rats hypoxiques (Figures 39 et 40); il s'agit donc probablement d'une réponse à la restriction calorique. Néanmoins, et seulement dans le SOL, on note une élévation moindre dans le groupe hypoxique 24 heures que dans le groupe *pairfed* ( $P < 0,05$  pour Fat CD36 et  $P < 0,001$  pour FABP-3). On retiendra aussi dans ce muscle, la tendance inverse observée pour ces deux gènes à sept jours de conditionnement, à savoir un niveau de transcrit plus élevé chez les animaux hypoxiques que chez les *pairfed*.



**Figure 39 :** quantification relative des ARNm Fat CD36 dans l’EDL (A) et le soléaire (B).  
 Les résultats sont exprimés en proportion du groupe normoxique ad libitum, moyenne  $\pm$  esm  
 Différents des normoxiques ad libitum \*\*\*  $P < 0,001$  \*  $P < 0,05$  - Différents des normoxiques pairfed du même temps \$  $P < 0,05$  - Différents des autres temps de la même condition \$\$\$  $P < 0,001$  §  $P < 0,05$



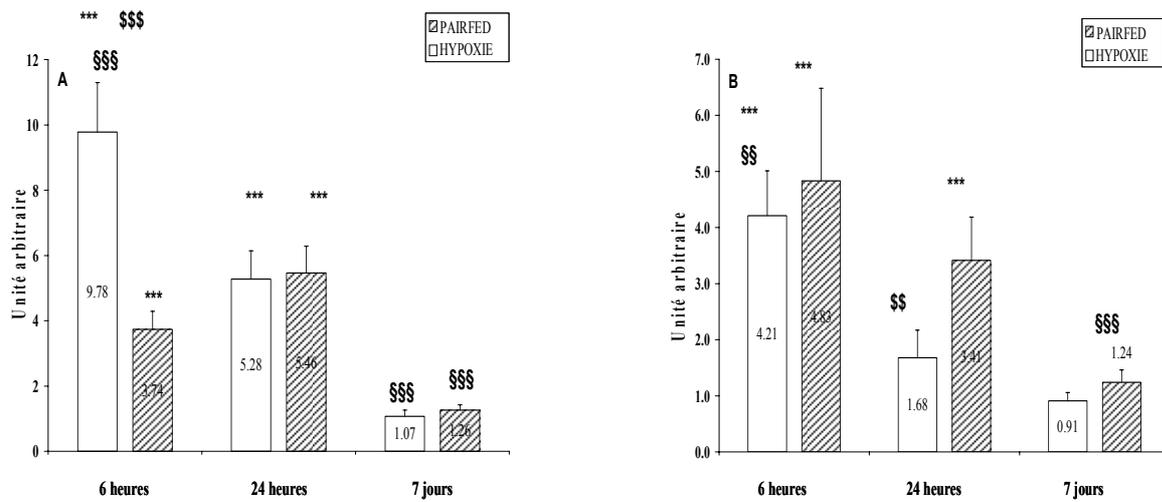
**Figure 40 :** quantification relative des ARNm FABP-3 dans l’EDL (A) et le soléaire (B).  
 Les résultats sont exprimés en proportion du groupe normoxique ad libitum, moyenne  $\pm$  esm  
 Différents des normoxiques ad libitum \*\*\*  $P < 0,001$  - Différents des normoxiques pairfed du même temps \$\$\$  $P < 0,001$  - Différents des autres temps de la même condition \$\$\$  $P < 0,001$  §  $P < 0,05$

### 1.3 Régulation substrat spécifique du flux mitochondrial entrant

Alors que dans le SOL, les transcrits PDK-4 augmentent de façon comparable dans les groupes *pairfed* et hypoxique à 6 heures de conditionnement (Figure 41), il existe un effet additif de l'hypoxie dans l'EDL (x 2,6 par rapport au groupe *pairfed* 6h,  $P < 0,001$ ). Alors que dans le SOL, PDK-4 semble répondre uniquement à la restriction calorique, dans l'EDL il semble y avoir une double stimulation par l'hypoxie *per se* et par la restriction calorique. A 24 heures, il persiste dans les deux muscles un effet de la restriction calorique mais qui est limitée dans le SOL du groupe hypoxique ( $P < 0,01$  vs *pairfed*).

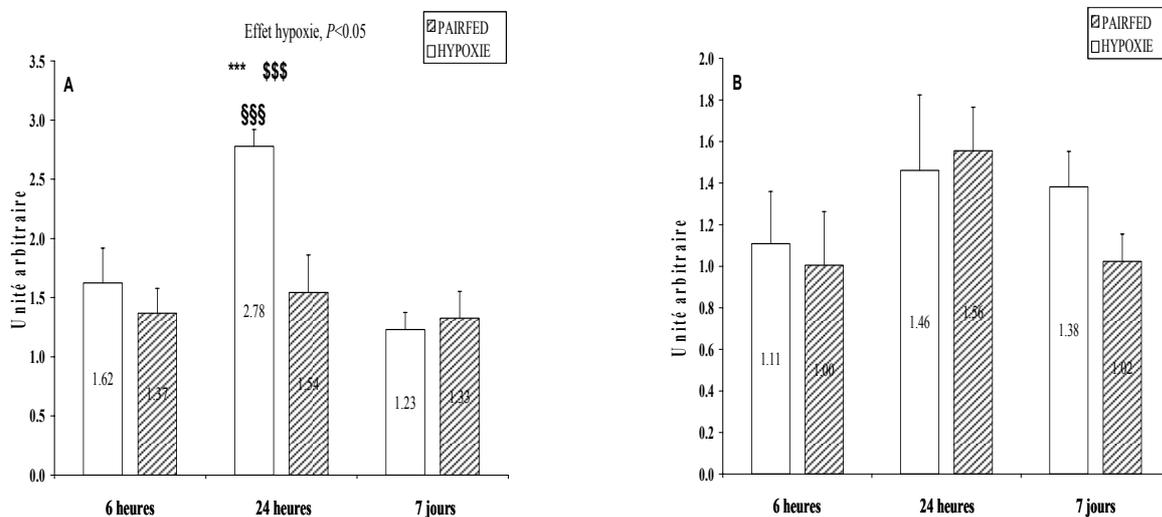
L'expression de CPT-1b n'est pas modifiée dans le SOL même si on retrouve, comme pour FABP et Fat CD36, une tendance à un niveau de transcrit plus élevé chez les rats hypoxiques que chez les *pairfed* sur le temps tardif (Figure 42). Dans l'EDL, il existe en revanche un effet global de l'hypoxie, retrouvé particulièrement à 24 heures ( $P < 0,001$  vs normoxiques *ad libitum* et vs *pairfed*).

Un des régulateurs indirect de l'activité CPT-1b, médié par la MCD qui accélère le turn-over en [malonyl-CoA], n'est lui modifié que par la restriction calorique avec une élévation des transcrits à 24 heures tant chez les *pairfed* que les hypoxiques dans les deux muscles (Figure 43). On observe à sept jours un effet plus marqué dans le groupe hypoxique que dans le groupe *pairfed* ( $P < 0,01$ ). Cet entretien d'une pression transcriptionnelle dans le SOL du groupe hypoxique après sept jours de conditionnement est tout à fait superposable à la tendance observée pour CPT-1b, Fat CD36 ou FABP-3.



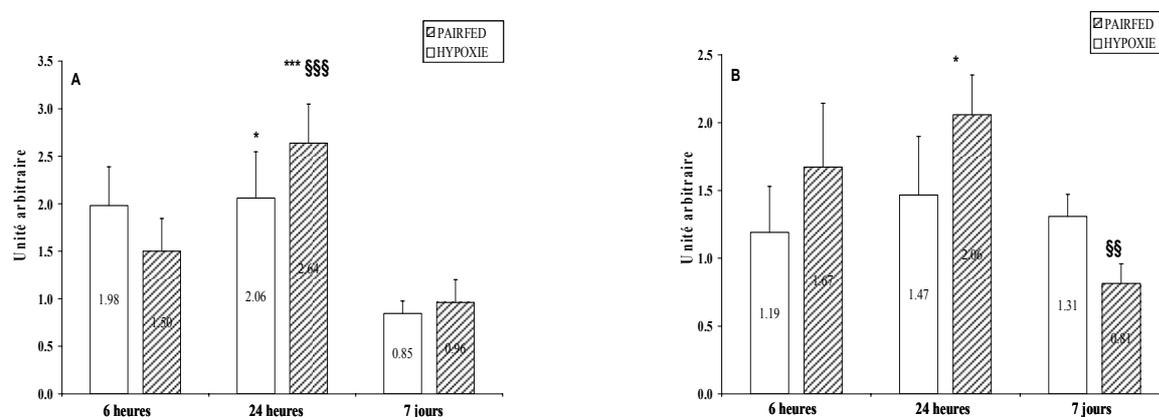
**Figure 41** : quantification relative des ARNm PDK-4 dans l'EDL (A) et le soléaire (B).

Les résultats sont exprimés en proportion du groupe normoxique ad libitum, moyenne  $\pm$  esm  
 Différents des normoxiques ad libitum \*\*\*  $P < 0,001$  - Différents des normoxiques pairfed du même temps \$\$\$  $P < 0,001$  \$\$  $P < 0,01$  - Différents des autres temps de la même condition §§§  $P < 0,001$  §§  $P < 0,01$



**Figure 42** : quantification relative des ARNm CPT-1b dans l'EDL (A) et le soléaire (B).

Les résultats sont exprimés en proportion du groupe normoxique ad libitum, moyenne  $\pm$  esm  
 Différents des normoxiques ad libitum \*\*\*  $P < 0,001$  - Différents des normoxiques pairfed du même temps \$\$\$  $P < 0,001$  - Différents des autres temps de la même condition §§§  $P < 0,001$



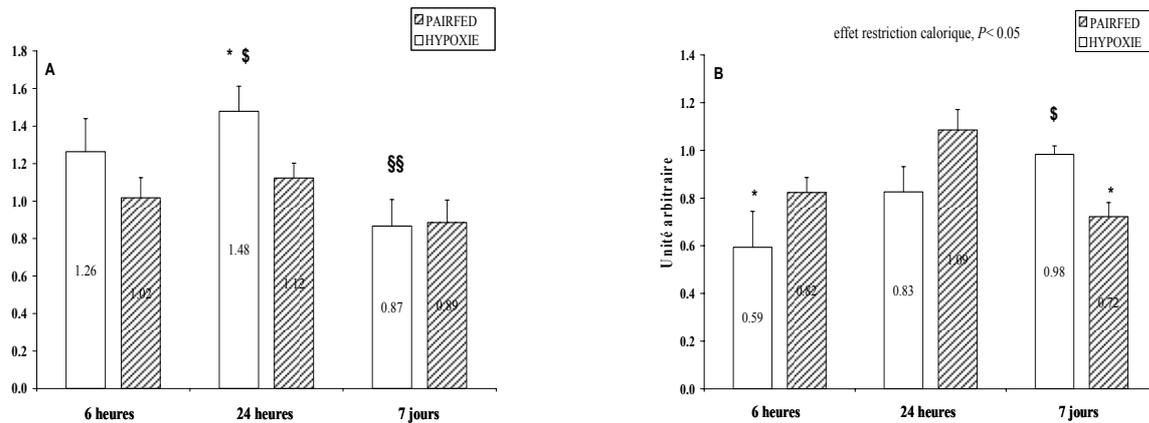
**Figure 43** : quantification relative des ARNm MCD dans l'EDL (A) et le soléaire (B).

Les résultats sont exprimés en proportion du groupe normoxique *ad libitum*, moyenne  $\pm$  esm  
Différents des normoxiques *ad libitum* \*\*\*  $P < 0,001$  \*  $P < 0,05$  - Différents des autres temps  
de la même condition §§§  $P < 0,001$  §§  $P < 0,01$  §  $P < 0,05$

#### 1.4 Voie de la $\beta$ -oxydation

Il existe peu de modulation aiguë de MCAD, hormis une diminution transitoire à 6 heures d'hypoxie dans le SOL et une induction à 24 heures d'hypoxie dans l'EDL (Figure 44). Pourtant à sept jours, dans le SOL, on retrouve à nouveau l'effet dissocié de l'hypoxie et du pair-feeding sur la quantité de transcrite (niveau préservé chez les hypoxiques et diminué chez les *pairfed*,  $P < 0,01$ ).

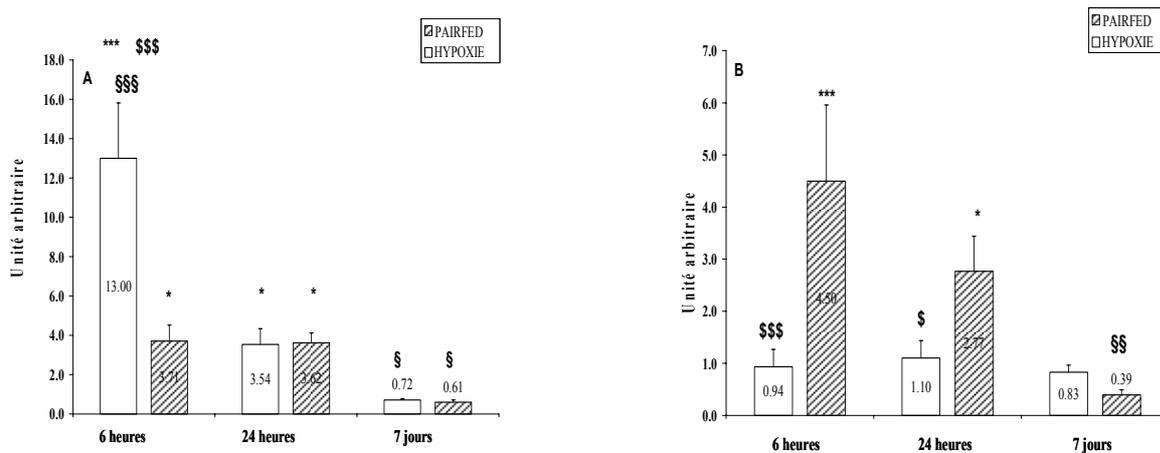
Pour UCP-3, l'évolution rappelle celle de PDK-4 avec une élévation des transcrits chez les *pairfed* à 6 heures et 24 heures évoquant un effet majeur de la restriction calorique (Figure 45). Néanmoins, alors que dans l'EDL, l'hypoxie potentialise l'induction à 6 heures de conditionnement ( $\times 3,5$  vs *pairfed*,  $P < 0,001$ ), dans le SOL, l'hypoxie limite la réponse à la restriction calorique sur les temps précoces ( $P < 0,001$  et  $P < 0,05$  respectivement à 6 et 24 heures). Cependant à sept jours, la même inversion de tendance que décrite précédemment pour MCD entre rats *pairfed* et hypoxiques est retrouvée dans le SOL.



**Figure 44** : quantification relative des ARNm MCAD dans l’EDL (A) et le soléaire (B).

Les résultats sont exprimés en proportion du groupe normoxique ad libitum, moyenne  $\pm$  esm

Différents des normoxiques ad libitum \*  $P < 0,05$  - Différents des normoxiques pairfed du même temps \$  $P < 0,05$  - Différents des autres temps de la même condition §§  $P < 0,01$



**Figure 45** : quantification relative des ARNm UCP-3 dans l’EDL (A) et le soléaire (B).

Les résultats sont exprimés en proportion du groupe normoxique ad libitum, moyenne  $\pm$  esm

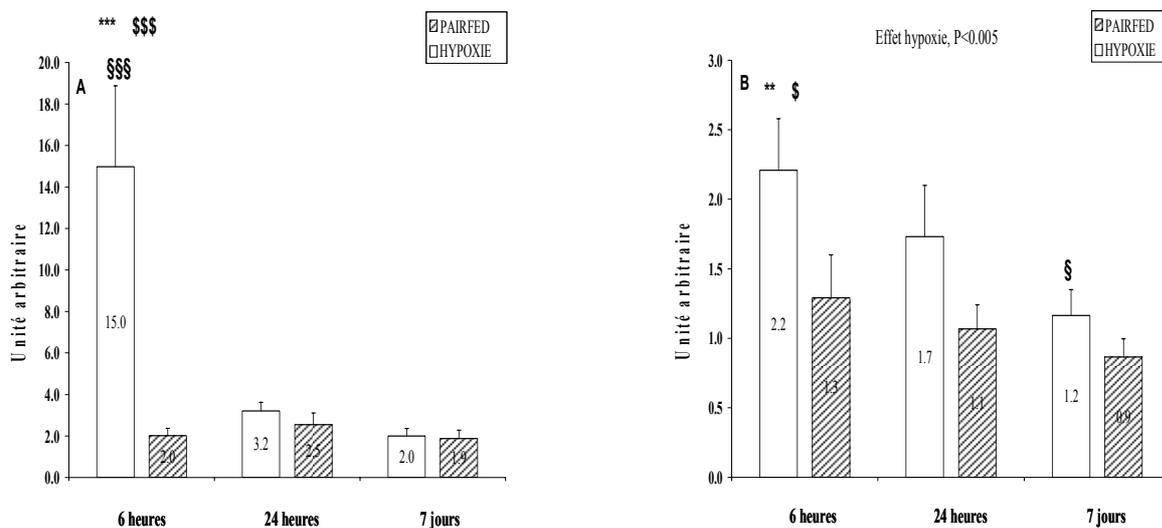
Différents des normoxiques ad libitum \*\*\*  $P < 0,001$  \*  $P < 0,05$  - Différents des normoxiques pairfed du même temps \$\$\$  $P < 0,001$  \$  $P < 0,05$  - Différents des autres temps de la même condition §§\$  $P < 0,001$  §§  $P < 0,01$  §  $P < 0,05$

## 2. Stimulus hypoxique et gènes sensibles à l’oxygène

### 2.1 Conséquences de la stabilisation d’Hif-1 : indicateurs indirects du niveau d’hypoxie tissulaire

REDD-1 qui est codé par le gène nommé *Ddit-4*, possède plusieurs séquences *Hypoxia responsive element* (HRE) ; la transcription du gène codant REDD-1 est induite par Hif-1 (Brugarolas and Kaelin, 2004, Horak, et coll., 2010).

REDD-1 est clairement induit pas l’hypoxie tant dans l’EDL que dans le SOL, mais avec un profil différent dans chacun des muscles (Figure 46). Ainsi, dans l’EDL, il existe une induction massive (x 15 par rapport au niveau d’expression des contrôles,  $P < 0,001$ ), très précoce (dès 6 heures) mais fugace puisque dès 24 heures, le niveau de transcrit est comparable entre les groupes hypoxique et *pairfed*. Dans le SOL en revanche, l’induction est beaucoup plus modérée (x 2,2,  $P < 0,01$ ) mais avec un effet global de l’hypoxie sur l’ensemble de la cinétique ( $P < 0,05$ ).



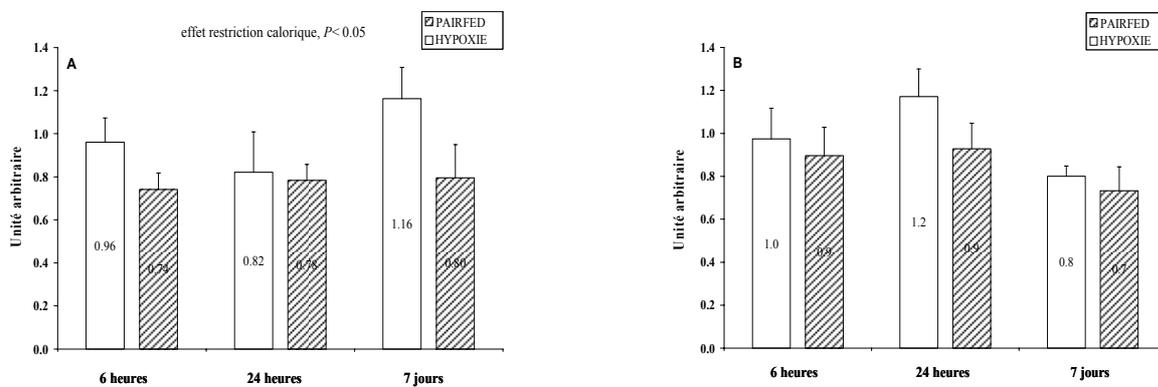
**Figure 46** : quantification relative des ARNm REDD-1 dans l’EDL (A) et le soléaire (B).

Les résultats sont exprimés en proportion du groupe normoxique *ad libitum*, moyenne  $\pm$  esm

Différents des normoxiques *ad libitum* \*\*\*  $P < 0,001$  \*\*  $P < 0,01$  - Différents des normoxiques *pairfed* du même temps \$\$\$  $P < 0,001$  \$  $P < 0,05$  - Différents des autres temps de la même condition §§§  $P < 0,001$  §  $P < 0,05$

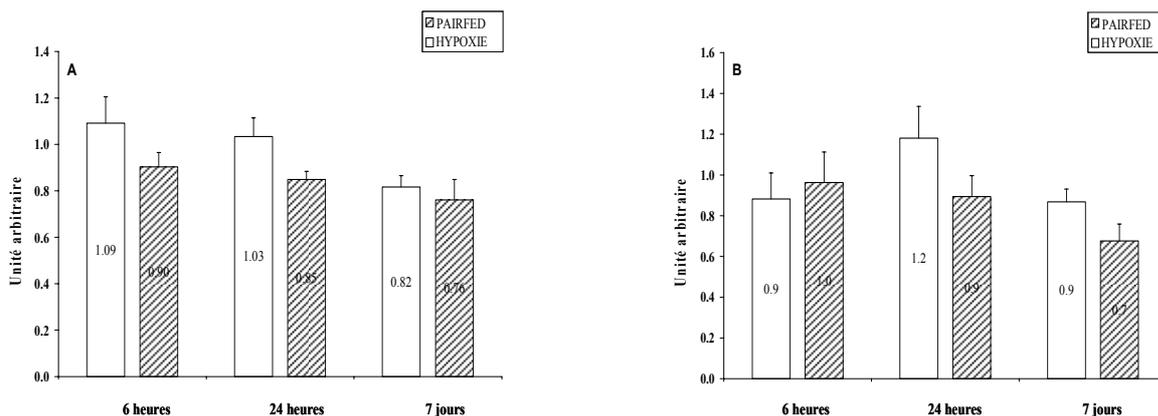
## 2.2 Régulation de la glycolyse

Nous nous sommes ensuite plus spécifiquement attachés à l'étude de gènes impliqués dans le métabolisme glycolytique et connus comme gènes cibles de Hif-1 (Semenza, 2007). Ainsi, ni LDH-A, gène codant pour l'isoforme musculaire de la LDH, impliquée dans la conversion du pyruvate en lactate, ni PDK-1, une autre isoforme de PDK mais possédant une séquence HRE sur son promoteur, ne sont modifiées par l'hypoxie, que ce soit dans l'EDL ou dans le SOL (Figures 47 et 48). Pour LDH-A, on note par contre un effet global du pair-feeding qui diminue discrètement mais de façon continue ce transcrit dans l'EDL.



**Figure 47** : quantification relative des ARNm LDH-A dans l'EDL (A) et le soléaire (B).

*Les résultats sont exprimés en proportion du groupe normoxique ad libitum, moyenne ± esm*

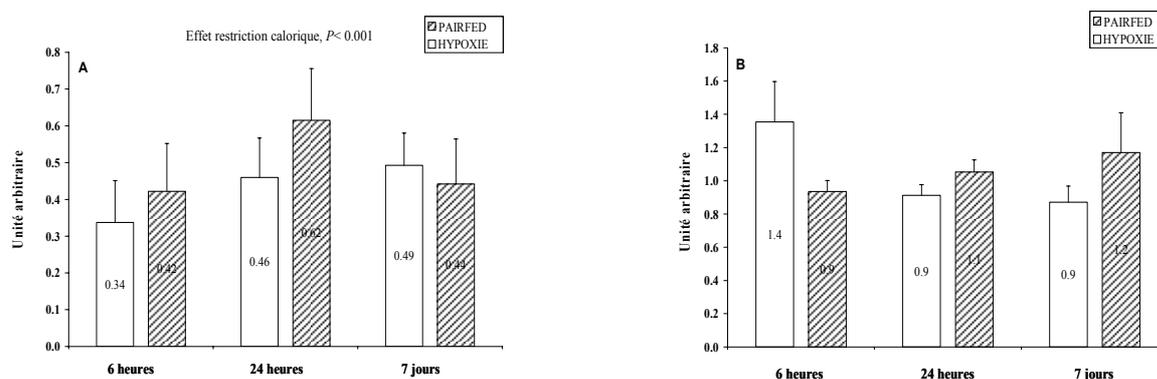


**Figure 48** : quantification relative des ARNm PDK-1 dans l'EDL (A) et le soléaire (B).

*Les résultats sont exprimés en proportion du groupe normoxique ad libitum, moyenne ± esm*

### 3. Muscline et sensibilité à l'insuline ?

Nous avons également étudié les transcrits pour la muscline, myokine dont on a pu évoquer un rôle dans l'insulinorésistance, étant beaucoup plus exprimée dans les fibres rapides, insulinorésistantes que dans les fibres lentes insulinosensibles (Banzet, et coll., 2007). Outre le niveau d'expression entre l'EDL et SOL qui confirme cette répartition, nous n'avons trouvé aucune modulation de la muscline dans le SOL (figure 49). Par contre, dans l'EDL, il existe une diminution nette et durable de son expression, qui est quasiment divisée par deux aussi bien chez les animaux *pairfed* que chez les hypoxiques et à tous les temps du conditionnement. Cet effet n'est absolument pas modulé par le stimulus hypoxique *per se*, ce qui exclut une sensibilité importante de ce gène à la baisse en oxygène, mais évoque une amélioration de l'insulinosensibilité sous l'effet pur de la restriction calorique dans l'EDL.



**Figure 49** : quantification relative des ARNm muscline dans l'EDL (A) et le soléaire (B).

Les résultats sont exprimés en proportion du groupe normoxique *ad libitum*, moyenne  $\pm$  esm

## V. Eléments de discussion

### A. Réponses métaboliques précoces à l'hypoxie : temps 6h et 24h

Lorsque nous étudions les effets de l'exposition à l'hypoxie aiguë, il est particulièrement important de prendre en compte la part attribuée au déséquilibre de la balance énergétique dans cette réponse. En effet, compte tenu d'une anorexie induite par l'hypoxie, il existe une réduction massive de la prise alimentaire durant les premiers jours de mise en conditionnement, ce qui peut en soi induire des modulations transcriptionnelles de gènes du métabolisme des AG. Aussi notre plan expérimental comporte non seulement des animaux normoxiques *ad libitum* mais aussi des animaux *pairfed*, c'est-à-dire appariés en prise

alimentaire. Dans la suite de la discussion, nous appellerons gènes sensibles à la « restriction calorique » l'ensemble des gènes modifiés à la fois dans les groupes *pairfed* et hypoxiques.

S'il existe déjà très peu d'études s'intéressant aux modulations transcriptionnelles aiguës dans le muscle lors d'une exposition à l'hypoxie, aucune ne prend en compte les effets de la restriction calorique ou encore une spécificité liée au phénotype musculaire (Dapp, et coll., 2006).

Nous pouvons distinguer un premier groupe de gènes incluant les transporteurs membranaires aux AG (Fat CD36 et FABP-3), la malonyl-CoA déshydrogénase (MCD), ou encore la pyruvate déshydrogénase kinase 4 (PDK-4) qui sont induits par la restriction calorique aussi bien dans l'EDL que dans le SOL.

Ensuite, il existe des gènes ne répondant que dans les groupes hypoxiques tels PPAR- $\delta$  et PGC-1 $\alpha$  qui sont uniquement induits par l'hypoxie dans les deux types de muscles.

Enfin, certains gènes ont une modulation dissociée entre types de muscle : la myosine est réprimée par la restriction calorique mais uniquement dans l'EDL. CPT-1 et MCAD sont induits à l'hypoxie mais uniquement dans l'EDL. UCP-3 et PDK-4 ne répondent dans le SOL qu'à la restriction calorique alors qu'ils sont aussi induits par l'hypoxie dans l'EDL.

Pour y voir plus clair, nous nous efforcerons dans un premier temps de lister les différents paramètres hormonaux et cellulaires impliqués dans la réponse à l'hypoxie et à la restriction calorique puis de décrire la spécificité des réponses en fonction du type musculaire avant de proposer une explication à nos données.

### 1. Potentialisation des effets de la restriction calorique par l'hypoxie dans l'EDL

Outre les effets de la restriction calorique sur PDK-4 et UCP-3, il existe aussi un effet propre et additif de l'hypoxie aux temps précoces d'exposition 6 heures et 24 heures, sur lequel nous reviendrons dans le paragraphe consacré à ceux-ci.

### 2. Limitation des effets de la restriction calorique par l'hypoxie dans le soléaire

Pour la plupart des gènes impliqués dans le métabolisme des AG, Fat CD36, FABP, PDK-4, MCD, UCP-3, il existe un frein de l'hypoxie sur les effets observés chez les rats *pairfed* allant d'une simple tendance à un effet prononcé (UCP-3). Compte tenu de ce qui précède, il est

difficilement concevable que l'hypoxie *per se* n'exerce un effet répressur que dans le SOL alors qu'il est stimulateur dans l'EDL. Au pire, une absence d'effet serait envisageable.

En revanche, un constat déjà ancien dans l'équipe a pu être établi selon lequel les animaux *pairfed* ont un déséquilibre plus important de leur balance énergétique. En effet, une hyperactivité motrice correspondant à un comportement de recherche alimentaire a été clairement établi alors que l'exposition aiguë à l'hypoxie induit au contraire une hypoactivité motrice (Bigard, et coll., 2000). Or, même si EDL et SOL sont exposés aux mêmes taux circulants d'AGL, ils ne présentent pas la même sensibilité à ce paramètre. Alors que dans un muscle glycolytique, la réponse au jeûne est assez bien préservée même si l'on bloque l'élévation des AGL par de l'acide nicotinique, celle-ci est abolie dans un muscle oxydatif (Samec, et coll., 1998). Ceci pourrait donc en partie participer à une réponse accrue à la restriction calorique dans le SOL des animaux *pairfed* alors que cette différence n'est pas sensible dans l'EDL.

Enfin, alors que l'hypoactivité induite par l'exposition à l'hypoxie affecte certainement plus un muscle postural comme le SOL que l'EDL, l'hyperactivité motrice générée par la situation de pair-feeding affecte certainement peu l'EDL qui est un muscle de la loge antérieure, quasiment pas recruté à la course.

### 3. Modulation des principaux facteurs de l'oxydation des AGLC

Concernant le rôle majeur que jouent d'une part la baisse d'insulinémie et de l'autre l'augmentation des AGL plasmatiques dans la réponse à la restriction calorique, on note que ces variations sont comparables voire un peu émoussées dans le groupe hypoxique comparativement au groupe *pairfed*. Aussi les variations de transcrits qu'on observe dans le groupe hypoxique ne sont *a priori* pas liées à une perturbation accrue de ces deux paramètres. Ceci est d'ailleurs en accord avec le constat fait précédemment d'une balance énergétique plus déséquilibrée chez les animaux *pairfed* que chez les animaux hypoxiques, mais reste néanmoins une limite de notre modèle *pairfed* qui n'équilibre pas parfaitement la balance énergétique. Mais s'il est possible chez l'homme de contraindre à une prise alimentaire en hypoxie afin de garantir une équivalence des apports, ceci est inenvisageable sur modèle animal (Barnholt, et coll., 2006). Nous nous appuyerons néanmoins sur leurs résultats qui montrent que la baisse spontanée des apports caloriques en hypoxie tend à limiter la réponse

adrénergique ainsi que les élévations initiales de la glycémie et de l'insulinémie liées aux effets propres de l'hypoxie.

Il est par ailleurs assez évident que le stimulus hypoxique ne peut être présent que dans les groupes hypoxiques, même si l'exposition systémique à l'hypoxie n'est pas forcément suffisante pour induire une hypoxie tissulaire (cf. ci-dessous).

Enfin, en plus de ces réponses systémiques, il existe des réponses – ou au moins une sensibilité – tissu spécifique (cf. tableau étude 1). Alors que l'EDL est à la base plus résistant à l'insuline que le SOL, la restriction calorique pourrait exercer sur celui-ci un effet facilitateur de l'insuline (cf. diminution de l'expression de la muscline sous l'effet de la restriction calorique).

	HYPOXIE		RESTRICTION CALORIQUE		SOURCES
	EDL	SOL	EDL	SOL	
<b>Balance énergétique</b>	-		---		Etude 2
<b>Apport</b>	--		--		
<b>Dépense</b>	-		+		Bigard 2000
<b>Stimulus hypoxique</b>	+++	+	∅	∅	Pisani 2005 Dapp 2006 Lunde 2010
<b>[AGL]</b>	↑↑		↑↑		Etude 2
<b>Sensibilité aux AGL</b>	-	++	-	++	Samec 1998
<b>[insuline]</b>	Moindre ↓ à 24h puis ↓		↓		Barnholt 2006 Etude 2
<b>Sensibilité à l'insuline</b>	↑	≈	↑	≈	Etude 2
<b>[catécholamines]</b>	↑↑		≈		Mazzeo 1994,1995, 1998 Robert 1996 Barnholt 2006
<b>[corticotérorone]</b>	↑ à 24h puis ↓		↑		Kanstrup 1999 Chen 1996 et 2004

**Tableau 4 :** synthèse de la modulation des principaux facteurs de l'oxydation des AGLC

#### 4. Effets liés à la restriction calorique

Nous observons donc un effet directement lié à la restriction calorique notamment sur les transports des AG, MCD et PDK-4, dans les deux muscles squelettiques. Cet effet sur le transport membranaire des AG a déjà été décrit dans le cœur lors d'une l'hypoxie (Chabowski, et coll., 2006) sans que l'on sache dans cette étude si cela était vraiment lié à un effet spécifique de l'hypoxie. Il existe également un effet net de la restriction sur PDK-4, classiquement retrouvé (Harris, et coll., 2001, Wu, et coll., 1999, Wu, et coll., 2001)) et qui participe certainement à l'orientation de substrat en limitant le flux de pyruvate dans le muscle de façon à économiser le glucose et à le laisser à disposition des organes exclusivement glucodépendants en période aiguë de jeûne, notamment le cerveau.

La première chose remarquable est l'absence de modulation des deux isoformes PPAR- $\alpha$  et  $\delta$  impliquées dans la régulation de ces cibles transcriptionnelles.

S'il a été montré un rôle central de PPAR- $\alpha$  dans la réponse au jeûne, c'est essentiellement par son action sur le foie. En effet, des modèles de souris déficientes pour PPAR- $\alpha$  présentent des hypoglycémies sévères lors de la phase de jeûne par insuffisance de néoglucogenèse et de céto-genèse hépatique (Barak and Kim, 2007, Escher, et coll., 2001, Kersten, et coll., 1999). Par contre, concernant le muscle squelettique les choses sont moins nettes. Ainsi, Holness montre bien que des souris déficientes pour PPAR- $\alpha$  conservent une induction tout à fait normale de la transcription de PDK-4 au jeûne (Holness, et coll., 2002) alors que la même équipe avait auparavant montré le rôle indispensable de PPAR- $\alpha$  dans le rein et le foie (Holness, et coll., 2002, Wu, et coll., 2001). Ceci suggère tout au moins la capacité de suppléance de PPAR- $\delta$  dans les réponses musculaires, même si celle-ci n'a pas toujours été retrouvée dans un modèle transgénique de double déficience PPAR- $\alpha$  et PPAR- $\delta$  (Bedu, et coll., 2007). Cependant, l'induction transcriptionnelle de PPAR- $\delta$  dans le muscle en réponse au jeûne est loin d'être retrouvée systématiquement dans la littérature. Ainsi alors qu'à 48h de jeûne, les cibles transcriptionnelles de PPARs (VLCAD, LCAD, MCAD, CPT-1b, CPT-2, UCP-3) sont induites, il existe une diminution de l'expression de PPAR- $\alpha$  et  $\delta$  (de Lange, et coll., 2004) même si, dans une étude ultérieure, une induction à 6 heures de jeûne a finalement pu être mise en évidence (de Lange, et coll., 2006). Aussi la régulation

transcriptionnelle de PPARs au cours du jeûne est loin d'être univoque avec une cinétique souvent fugace, labile et hétérogène entre les espèces (de Lange, et coll., 2007).

Dans notre étude cependant, compte tenu de notre cinétique de mesures initiales (6 et 24 heures) menée dans deux types de muscles, nous ne pensons pas être passés à côté d'une induction même transitoire. Il est donc évident que l'on peut observer une modulation de la transcription des gènes cibles sans aucune variation des facteurs de transcription impliqués. Ici, il est probable que l'élévation des AGL, ligands naturels des PPARs, soit suffisante pour augmenter l'efficacité transcriptionnelle des PPARs sans besoin de moduler directement la quantité de facteurs de transcription présente. Outre le rôle des AGL comme activateurs des PPARs, certaines cibles transcriptionnelles répondent également à la voie insulinique. Ainsi, l'insuline est un régulateur négatif majeur de l'expression de PDK-4 (Lee and Kim, 2010), la baisse d'insulinémie libérant FoxO-1 qui est un puissant inducteur de PDK-4 (Furuyama, et coll., 2003).

***Il existe donc une induction de certaines cibles PPARs par la restriction calorique, mais retentissant essentiellement sur les étapes de transport membranaire des AG et assez peu les étapes en aval.***

Toutefois, les modulations des AGL et de l'insulinémie lors de la restriction calorique induite par l'exposition à l'hypoxie n'expliquent qu'en partie ce qui est observé, notamment pour les variations d'UCP-3 et de PDK-4 dans l'EDL ; il existe donc bien des effets spécifiques de l'hypoxie.

#### 5. Effets propres de l'hypoxie

Alors que la concentration plasmatique d'AGL est identique chez les hypoxiques et chez les *pairfed*, que l'insulinémie est plus basse chez les *pairfed*, il existe pourtant une induction à 6h de conditionnement, respectivement quatre et trois fois plus importante d'UCP-3 et de PDK-4 dans l'EDL des animaux hypoxiques comparativement aux animaux *pairfed*.

De même, MCAD et CPT-1 sont induits à 24 heures d'hypoxie de façon significativement plus marquée que lors du pair-feeding. Dans l'EDL, l'exposition à l'hypoxie semble donc s'accompagner spécifiquement d'une activation transcriptionnelle de l'ensemble des étapes du

métabolisme des AG depuis leur entrée dans la fibre musculaire, jusqu'à leur oxydation mitochondriale en passant par leur transport dans la mitochondrie. Par contre, ceci n'est vrai que dans l'EDL. Ce qui est observé ici dans le SOL est en effet plutôt en accord avec les données issues d'un autre muscle très oxydatif, le cœur, où l'exposition aiguë à l'hypoxie semble avoir un effet dissocié sur le transport membranaire des AG, facilité par l'hypoxie et les étapes en aval qui ne subissent qu'une induction moindre pouvant aboutir à une orientation des AG vers leur stockage cytosolique sous forme de triglycérides ou de phospholipides (Chabowski, et coll., 2006).

Nous allons donc essayer d'expliquer ce qui peut participer à cet effet propre de l'hypoxie en commençant d'abord par étudier de façon indirecte l'intensité du stimulus hypoxique perçu par ces différents muscles et qui pourrait rendre compte de la spécificité tissulaire observée ici.

### 5.1 Perception du stimulus hypoxique par la voie Hif-dépendante

#### a) REDD-1

REDD-1 est un gène bien connu comme répondeur à l'hypoxie par un mécanisme dépendant de la stabilisation d'Hif-1 qui se fixe sur des séquences HRE.

S'il est induit dans le SOL et dans l'EDL, l'intensité de la réponse est clairement différente d'un muscle à l'autre (à peine x3 dans le SOL contre x13 dans l'EDL). Cette sensibilité accrue d'un muscle glycolytique vis-à-vis du stimulus hypoxique a déjà pu être mise en évidence en normoxie. Ainsi la transcription et la stabilisation d'Hif-1 $\alpha$  sont plus importantes dans un tibialis antérieur que dans un soléaire (Pisani and Dechesne, 2005) et sont confirmées récemment avec un rapport de 1 à 2 dans la quantité de protéine Hif-1 $\alpha$  entre un SOL et un EDL (Lunde, et coll., 2011). De plus, il semble exister un lien étroit entre phénotype métabolique et niveau d'expression Hif-1 (Lunde, et coll., 2011); ainsi quinze jours de suspension dans le soléaire avec une transition vers un phénotype plus glycolytique s'accompagne aussi d'un triplement de l'expression d'Hif-1 (Pisani and Dechesne, 2005). Même si le stimulus hypoxique n'avait alors pas été mis en évidence directement, notre équipe avait montré que l'augmentation de la transcription du VEGF, un autre gène oxygène sensible, à l'arrêt de l'exercice était le fait des fibres de type IIB et n'existait pas dans les fibres I, IIA ou IIX (Biro, et coll., 2003). Cette sensibilité particulière des fibres glycolytiques à l'hypoxie retrouvée dans plusieurs études peut être mise en rapport avec la taille plus

importante des fibres glycolytiques, ce qui augmente la distance de diffusion de l'oxygène des capillaires au centre des fibres, et majore le risque d'hypoxie cellulaire.

b) Autres gènes oxygène-sensibles possédant une réponse HRE et décrits comme répondant à la stabilisation de Hif-1.

Nous n'avons retrouvé ici aucune induction des enzymes classiques de la glycolyse censées répondre au stimulus hypoxique. Ainsi, ni les transcrits PDK-1 ni ceux de LDH-A ne sont augmentés dans le groupe hypoxique. Dans l'étude de Dapp, cette voie avait pourtant clairement été montrée comme induite dans le SOL après 24 h d'exposition à une hypoxie de niveau comparable (Dapp, et coll., 2006). Fonctionnellement, une augmentation de l'activité globale LDH et spécifique de LDH-M, isoforme de la protéine codée par le gène LDH-A, avait été retrouvée spécifiquement dans le SOL exposé à l'hypoxie comparativement au niveau des SOL *pairfed* (Py, et coll., 2005). On notera néanmoins que dans l'EDL, il existe un effet global du pair-feeding qui limite la transcription de LDH-A mais que cette limitation n'est pas retrouvée dans le groupe hypoxique. On peut ainsi interpréter le maintien du niveau de la transcription de LDH-A dans l'EDL au niveau des animaux normoxiques *ad libitum* comme un effet propre de l'hypoxie, comparé à la baisse enregistrée en situation de restriction calorique normoxique. Une diminution de l'activité LDH avait d'ailleurs été montrée préalablement dans l'EDL d'animaux normoxiques *pairfed* comparativement à des animaux vivant à La Paz (3700m d'altitude) (Rossignol, et coll., 2003).

***Finalemment, cette étude comme d'autres (McClelland and Brooks, 2002, Ou and Leiter, 2004), ne retrouve pas d'activation de la voie de la glycolyse lors d'une exposition in vivo à une altitude simulée de 5500 mètres ni dans un muscle oxydatif ni dans un muscle glycolytique. Cette activation est pourtant classiquement décrite in vitro sur cultures cellulaires exposées à 1% d'oxygène.***

## 5.2 Autres gènes répondant spécifiquement au stimulus hypoxique

UCP-3, PPAR- $\delta$  et PGC-1 $\alpha$  présentent une induction spécifique à l'hypoxie. Alors que pour les deux derniers gènes, l'induction existe dans les deux types de muscle, l'induction d'UCP-3 est spécifique à l'EDL. L'induction d'UCP-3 peut en partie être expliquée par celle de PPAR- $\delta$  dont il est une cible. Néanmoins, l'absence de réponse dans le SOL, alors que PPAR-

$\delta$  y est également induit, laisse à penser que ce gène répond au stimulus hypoxique, mais de façon plus intense dans l'EDL que dans le SOL. D'ailleurs, cette réponse d'UCP-3 à l'hypoxie a déjà été notée par le passé (Zhou, et coll., 2000). Plus récemment, il a été montré *in vitro* qu'UCP-3 répondait à l'hypoxie par le biais d'ATF-1 (Active transcription factor-1), facteur de transcription appartenant à un complexe de régulation multiprotéique induit à l'hypoxie (Lu and Sack, 2008).

Nous avons constaté avec étonnement une induction précoce des gènes PPAR- $\delta$  et de PGC-1 $\alpha$  spécifiquement en réponse à l'hypoxie, à la fois dans le SOL et dans l'EDL ; même si, comme pour REDD-1, les variations sont plus marquées dans l'EDL.

A première vue, cette observation va à l'encontre des données de la littérature qui retrouvent au moins dans le cœur une inhibition de PPAR- $\alpha$  après exposition *in vivo* à deux modèles d'hypoxie, l'un par hémodilution isovolémique, l'autre par traitement au chlorure de cobalt (Razeghi, et coll., 2001). D'autres études menées *in vitro* sur cardiomyocytes montrent que, plus qu'une diminution d'expression de PPAR- $\alpha$ , il existe une moindre capacité de fixation du dimère PPAR- $\alpha$ -RXR sur l'ADN cible, pouvant contribuer à limiter l'efficacité transcriptionnelle de PPAR- $\alpha$  (Belanger, et coll., 2007, Huss, et coll., 2001).

Plus récemment, dans un modèle de souris surexprimant Hif-2 de façon constitutive, Aragones montre que les muscles squelettiques de ces souris possèdent un phénotype résistant à l'ischémie *via* une induction de la transcription de PPAR- $\alpha$ . D'ailleurs cette protection est abolie chez des souris déficientes pour PPAR- $\alpha$ , mais mimée par un pan-agoniste PPAR, le bezafibrate (Aragones, et coll., 2008). Par ailleurs, il a récemment été montré dans le cœur que PPAR- $\gamma$  possédait une séquence HRE et était susceptible de répondre à l'hypoxie (Krishnan, et coll., 2009).

Compte tenu du peu de données sur les conséquences d'une exposition *in vivo* à l'hypoxie, l'absence d'induction dans les groupes *pairfed* et la prédominance de l'induction dans l'EDL posent sérieusement la question de savoir si PPAR- $\delta$  ne pourrait pas être un gène oxygène sensible.

Concernant PGC-1 $\alpha$ , en tant qu'acteur central de la biogenèse, une répression de ce facteur à l'hypoxie était plutôt attendue compte tenu de données anciennes (Howald, et coll., 1990) et plus nouvelles (Cerretelli and Gelfi, 2010) qui retrouvent, ou une absence de modification, ou même une altération de la biogenèse à moyen terme d'une exposition à l'hypoxie. Cependant,

notre observation pourrait concerner ici un phénomène extrême aigu et fugace dont les conséquences à terme seront discutées dans la discussion générale. Ainsi, dans l'étude en transcriptomique de Dapp, il est aussi retrouvé, dans le soléaire, une induction de certains composants de la chaîne respiratoire : cytochrome c, COX-4, COX-5 et COX-6 (Dapp, et coll., 2006). Une autre étude montre dans le cerveau une induction à la 6<sup>ème</sup> heure d'hypoxie, des gènes Tfam et NRF-1, cibles de PGC-1 $\alpha$  impliqués dans la biogenèse mitochondriale (Yin, et coll., 2008). Aussi, au moins à court terme, pourrait exister une induction passagère des divers acteurs de la biogenèse mitochondriale.

L'origine de l'induction de PGC-1 $\alpha$  dès l'arrêt de l'exercice et celle retardée de PPAR- $\delta$  après 4 heures de récupération avait déjà fait l'objet d'une interrogation et notamment du rôle joué par les AGL. Dans un élégant protocole expérimental utilisant des stratégies nutritionnelles pré-exercice, Russel avait ainsi pu montrer que l'absence d'élévation des AGL à l'exercice ne bloquait pas les mouvements transcriptionnels de ces deux gènes. Les auteurs montraient aussi que l'induction de PPAR- $\delta$  n'était pas la simple conséquence d'une élévation de PGC-1 $\alpha$  (Russell, et coll., 2005). D'autre part, si les modifications du calcium intracellulaire sont tout à fait cohérentes avec la cinétique d'élévation de PGC-1 $\alpha$  dès l'arrêt de l'exercice, elles le sont moins avec la réponse retardée observée sur PPAR- $\delta$ . Le rôle propre joué par l'hypoxie n'avait même été évoqué par les auteurs.

Nous nous sommes donc efforcés de lister les principaux facteurs connus comme inducteurs de PPAR et PGC-1 et pouvant être présents conjointement au stimulus hypoxique, même si nous n'avons pour l'instant aucun argument biologique pour conforter ou infirmer nos hypothèses.

#### ► L'AMPK

Enfin, l'activation de l'AMPK, témoin d'un déficit énergétique, a souvent été proposée lors de l'exposition à l'hypoxie même si les études le retrouvant *in vivo* manquent encore. Or il existe un lien entre l'activation de l'AMPK et la transcription de PGC-1 mis en évidence à l'exercice (Irrcher, et coll., 2008, Jorgensen, et coll., 2005, Terada, et coll., 2002). Concernant le lien entre PPAR- $\delta$  et AMPK, la question est beaucoup plus discutée. S'il a pu être montré une activation de l'AMPK par un agoniste PPAR- $\delta$  (Kramer, et coll., 2007),

l'inverse n'est pour l'instant que putatif même si Narkar a montré une interrelation entre PPAR et AMPK à la fois physique (coimmunoprécipitation) mais aussi fonctionnelle puisqu'il existe un profil transcriptionnel propre à l'association d'un agoniste PPAR- $\delta$ , le GW 501516, avec un activateur de l'AMPK, l'AICAR (Narkar, et coll., 2008).

► La stimulation adrénérgique

L'hypoxie aiguë est, au moins chez l'homme, responsable d'une stimulation adrénérgique (Mazzeo, et coll., 1994) majeure qui pourrait, *via* CREB, induire PGC-1 $\alpha$  (Chinsomboon, et coll., 2009, Watt, et coll., 2004 ).

► Les ROS

La production de ROS lors d'une exposition aiguë et sévère à l'hypoxie (Magalhaes, et coll., 2005) pourrait aussi participer directement à la transcription de PGC-1 $\alpha$  (Irrcher, et coll., 2009, Silveira, et coll., 2006 )

► La voie calcium dépendante

L'augmentation du calcium intracellulaire a pu être montrée dans les cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire de l'artère pulmonaire lors d'une exposition hypoxique (Bonnet, et coll., 2007) aboutissant à l'activation de la voie de la calcineurine dans l'artère pulmonaire (Bonnet, et coll., 2007) mais aussi dans le tissu pulmonaire (Koulmann, et coll., 2006) après 6 heures d'exposition. Or les voies dépendantes du calcium (Olesen, et coll., 2010 ), notamment la voie des CamKinases, a pu être impliquée dans la transcription de PGC-1 $\alpha$ , soit par action directe sur CREB (Akimoto, et coll., 2004), soit par activation de p38 MAPK (Akimoto, et coll., 2005), soit encore par activation de l'AMPK.

Quant à PPAR- $\delta$ , c'est seulement son activation par la voie calcineurine qui a été décrite pour l'instant (Gaudel, et coll., 2008 , Wagner, et coll., 2009) sans que l'inverse n'ait pu être montré. De plus, dans une étude *in vitro*, si la réponse transcriptionnelle de PGC-1 $\alpha$  a pu être déclenchée par une libération du calcium cytosolique, aucune réponse sur la transcription de PDK-4 n'a pu être enregistrée (Kusuhara, et coll., 2007). La transcription de PDK-4 étant fortement dépendante de PPAR- $\delta$ , si PPAR- $\delta$  avait été induit par l'élévation de la concentration intracytosolique en calcium, on aurait dû observer une augmentation des transcrits PDK-4.

Aussi si le calcium était impliqué dans la transcription de PGC-1 $\alpha$  en réponse à l'hypoxie, son rôle est peu probable dans la participation à l'induction de PPAR- $\delta$ .

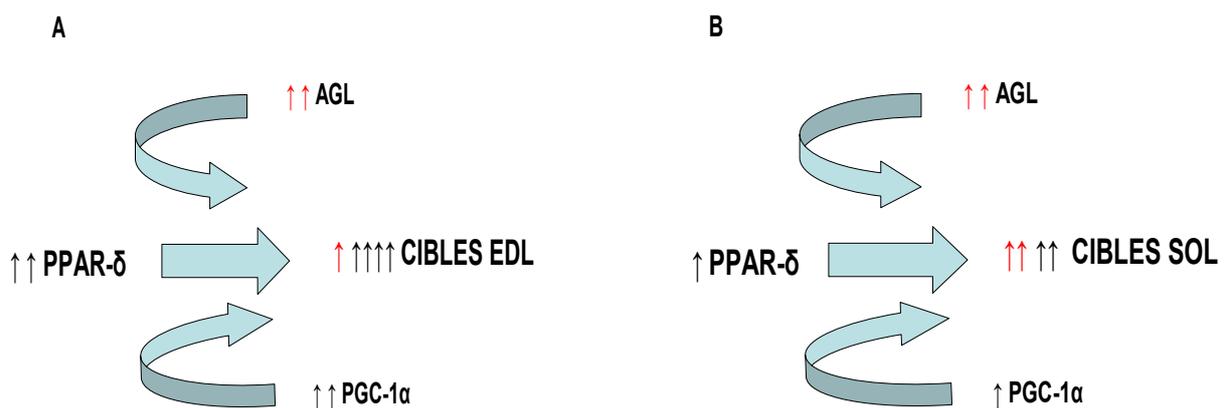
► L'hypothermie

Enfin, il ne faut pas oublier le contexte historique dans lequel a été décrite la stimulation de la transcription de PGC-1 $\alpha$  : à savoir l'exposition au froid (Puigserver, et coll., 1998). Or il existe lors des premiers jours d'exposition à l'hypoxie une hypothermie pouvant aller jusqu'à un abaissement à 33°C de la température corporelle durant les 48 premières heures d'exposition à 5500 m (données non publiées du laboratoire, Céline Chevrier).

► La boucle d'autoamplification et d'amplification mutuelle de PGC-1 $\alpha$ -PPAR- $\delta$

Par ailleurs, outre le fait que PGC-1 $\alpha$  soit le cofacteur indispensable de PPAR- $\delta$  pour l'induction transcriptionnelle de ses cibles, il a été décrit une boucle de régulation de PPAR- $\delta$  sur la transcription de PGC-1 $\alpha$  (Hondares, et coll., 2007, Schuler, et coll., 2006) et inversement (Wang, et coll., 2003). De plus, une autoamplification de PGC-1 $\alpha$  sur sa propre transcription a aussi été évoquée (Handschin, et coll., 2003). Si ces boucles d'interactions positives réciproques ne peuvent se passer d'un point de départ extérieur, elles peuvent contribuer à amplifier le phénomène d'induction transcriptionnelle.

6. Proposition de la régulation transcriptionnelle lors d'une exposition in vivo à l'hypoxie



**Figure 50** : principaux acteurs susceptible d'induire la transcription de cibles PPAR lors d'une exposition à l'hypoxie dans l'EDL (A) et le SOL (B)

*En rouge, la contribution de la restriction calorique*

*En noir, la contribution de l'hypoxie*

Ce schéma de synthèse reprend le rôle respectif dans le SOL et dans l'EDL des deux stimuli essentiels: AGL et PPAR- $\delta$ , respectivement médiés par la restriction calorique et l'hypoxie. Y sont représentés les poids respectivement comparables portés par la restriction et l'hypoxie dans le SOL, alors que l'EDL est essentiellement sensible au stimulus hypoxique.

*Nous pouvons envisager PPAR- $\delta$  comme un nouveau gène oxygène sensible en tenant compte :*

- de l'absence totale d'induction dans les groupes pairfed,*
- de la prédominance de l'induction dans l'EDL, manifestement plus sensible à l'hypoxie que le SOL,*
- de l'absence d'effet connu à ce jour des mouvements de calcium intracellulaire sur l'expression de ce gène.*

### *B. Réponses métaboliques retardées à l'hypoxie*

Alors que dans l'EDL, l'ensemble des transcrits étudiés sont revenus à un niveau comparable entre animaux hypoxiques et *pairfed* à sept jours de conditionnement, il existe une différence constamment retrouvée dans le SOL avec une quantité des transcrits impliqués dans le métabolisme des AG toujours un peu plus importante chez les animaux hypoxiques que chez les animaux *pairfed*. Par contre, il n'existe pas de modification des transcrits PDK-4. Quant à PGC-1 $\alpha$ , il est au contraire diminué dans le SOL des animaux hypoxiques comparativement au niveau enregistré chez les animaux *pairfed*.

Récemment, l'équipe de Ceretelli a publié deux études en protéomique relevant les réponses à l'hypoxie dans le muscle squelettique respectivement après quinze jours d'exposition à 10% d'oxygène dans le gastrocnémien de rat (De Palma, et coll., 2007) et après neuf jours d'exposition à 4500m dans le vaste externe chez l'homme (Vigano, et coll., 2008). Aucune de ces études ne possédait de groupe apparié en prise alimentaire. Dans les deux études, une diminution globale de l'ensemble des protéines mitochondriales était retrouvée indépendamment du type de métabolisme, glucidique ou lipidique. Ainsi, de façon proportionnelle et homogène, le complexe de la PDH, plusieurs enzymes de la  $\beta$ -oxydation et

l'ensemble des composants de la phosphorylation oxydative, tant au niveau de la chaîne respiratoire que de l'ATP-synthase, étaient altérés. Ces travaux, s'ils montrent une altération des capacités oxydatives globales dans le muscle après exposition à l'hypoxie, ne retrouvent pas d'atteinte spécifique du métabolisme des AG.

### 1. Persistance de l'altération de LDH-A en pair-feeding dans l'EDL

Les résultats de l'étude 2 montrant une limitation de la transcription de LDH-A associée à une activation majeure de PDK-4 dans l'EDL chez les animaux *pairfed* peuvent être mis en regard de l'augmentation des capacités oxydatives maximales en G3-P au bout de vingt et un jours de pair-feeding (étude 1) et qui nous était apparue surprenante. En effet, si la préservation de la glycolyse a pu être montrée au cours d'une restriction calorique dans les muscles glycolytiques (Bissonnette and Jeejeebhoy, 1998, Daneshrad, 1999) l'oxydation d'un substrat dérivé de la glycolyse est plus interpellante. Néanmoins, l'hypothèse suggérée dans l'étude, d'une oxydation du G3-P comme voie de dérivation à un flux glycolytique accru trouve ici des arguments. D'une part, l'activation de PDK-4 en situation de restriction calorique peut, en inactivant la PDH, freiner l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie et, d'autre part, l'altération de LDH-A peut limiter sa transformation en lactate. Il est donc possible d'observer dans une telle situation enzymatique une accumulation de phosphodihydroacétone qui serait alors transformé en glycérol 3-P par la G3-PDH (glycérol 3-P déshydrogénase) puis oxydé comme suggéré dans l'étude 1.

### 2. Dissociation des effets de l'hypoxie et de la restriction calorique à sept jours dans le soléaire

#### 2.1 Effets protecteurs de l'hypoxie sur la voie du transport des AG

Alors que lors des temps précoces, l'hypoxie apparaît dans le SOL systématiquement frénatrice sur l'ensemble des cibles du métabolisme des AG par rapport aux effets propres de la restriction calorique, il existe une inversion de la tendance à sept jours. Ainsi, pour Fat CD36, FABP, MCD, MCAD et CPT-1, la même tendance est retrouvée avec une préservation du niveau d'expression par rapport au niveau des contrôles *ad libitum* alors qu'il est sensiblement atténué chez les animaux *pairfed*. Cet effet retardé et durable de l'hypoxie

semble par contre tout à fait indépendant de l'expression de PPAR- $\delta$  dont le niveau est revenu à son niveau basal après 24 heures d'hypoxie.

Cet effet spécifique au SOL, et qui n'est certainement pas sans retentissement fonctionnel à moyen terme, est cependant difficile à expliquer. En effet le stimulus hypoxique est déjà peu sensible dans un SOL même de façon suraiguë, il est donc peu probable qu'une fois les adaptations systémiques mises en place ce stimulus soit renforcé. Par contre, on sait qu'à sept jours, les animaux sont sortis de leur léthargie motrice et récupèrent une activité locomotrice. Le SOL étant un muscle postural, il est possible qu'il soit plus affecté que l'EDL par la quasi immobilité des premiers jours d'hypoxie et que l'on observe ici les effets combinés d'une reprise d'activité à l'hypoxie. Or, Dapp a bien montré que la remise sur pattes après sept jours de suspension pouvait moduler la réponse à l'hypoxie d'un muscle postural (Dapp, et coll., 2006).

Une telle induction avait été retrouvée sur MCAD et PDK-4 dans le ventricule gauche (VG) après deux semaines d'exposition à une hypoxie de niveau comparable et alors qu'en phase initiale de cette étude une tendance inverse avait été montrée (Sharma, et coll., 2004). Cet effet étant retrouvé dans le VG qui ne subit pas de réponse hypertrophique, les auteurs discutent d'une phase de récupération du métabolisme des AG sous l'effet d'une exposition à l'hypoxie qui se prolonge. Ceci pourrait donc être une cinétique commune aux muscles très oxydatifs.

Cependant, cet effet bénéfique de l'hypoxie semble spécifique au métabolisme des AG et ne concerne pas en globalité la population mitochondriale et les capacités oxydatives globales. Ainsi, d'autres données issues de la même équipe montrent une altération des transcrits PGC-1 $\alpha$ , et une tendance à la diminution de COX II et COX IV dans le VG d'animaux exposés quatre semaines à 11% d'oxygène (Zungu, et coll., 2008).

## 2.2 Effets limitants sur la stimulation de PGC-1 induite par une restriction calorique modérée

En effet, alors qu'il existe une élévation des transcrits PGC-1 $\alpha$  aux temps précoces d'hypoxie tant dans le SOL que dans l'EDL, une diminution est observée à sept jours comparativement

aux animaux *pairfed*. Ainsi, l'hypoxie serait frénatrice de l'action de la restriction calorique. Revenons d'abord sur l'effet inducteur de la restriction calorique sur PGC-1 $\alpha$ . Celle-ci a déjà été décrite par Nisoli (Nisoli, et coll., 2005). Ainsi, il pourrait exister un effet favorable de la restriction calorique sur la biogenèse mitochondriale non seulement *via* la quantité de transcrits PGC-1 présente mais aussi par augmentation de l'efficacité transcriptionnelle de PGC-1, notamment par phosphorylation par l'AMPK et GSK-3 mais aussi par déacétylation par les sirtuines (Finley and Haigis, 2009). FoxO-1, puissant activateur de la transcription de PGC-1, *a priori* activé par la baisse durable d'insulinémie lors de restriction calorique, pourrait également participer à cet effet même si son rôle a mieux été décrit dans la régulation de la néoglucogenèse hépatique.

Un tel effet limitant de l'hypoxie sur PGC-1 $\alpha$  a déjà été décrit dans le diaphragme après exposition de sévérité comparable, retrouvant une altération des transcrits à sept jours puis de l'expression protéique à deux et quatre semaines (Gamboa and Andrade, 2010). De plus, comme il a été récemment suggéré un effet inhibiteur de l'hypoxie sur sirt-1 impliquant deux mécanismes dont l'un transcriptionnel et tous deux reliés par la baisse du rapport NAD<sup>+</sup>/NADH en hypoxie (Lim, et coll., 2010), cette altération de l'expression des sirtuines (Regnault, et coll., 2010) pourrait freiner les effets bénéfiques de la restriction calorique sur la biogenèse mitochondriale.

***Il existe une réponse majeure des cibles PPARs impliquées dans le métabolisme des AG à la restriction calorique et pas d'activation de la glycolyse par l'hypoxie. Cette réponse à la restriction calorique est néanmoins modulée par l'hypoxie : accentuée aux temps précoces dans l'EDL et limitée dans le SOL. L'hypoxie semble au contraire entretenir la réponse des cibles à la restriction calorique de façon plus prolongée dans le SOL. Enfin, il existe une nette spécificité tissulaire dans la réponse à l'hypoxie, faisant apparaître une plus grande sensibilité à l'hypoxie de l'EDL. Cependant, dans ces deux muscles, PPAR- $\delta$  et PGC-1 $\alpha$  répondent spécifiquement à l'hypoxie.***

## **Etude 3 : modulation du métabolisme des AG par un agoniste PPAR- $\delta$**

### **I. Justification du travail**

Compte tenu de l'amélioration de l'affinité pour le palmitoyl carnitine montrée après une exposition chronique à l'hypoxie (étude n°1), nous avons complété cette analyse avec du palmitoyl CoA, produit directement dérivé de l'activation du palmitate par l'ACS. En effet, alors que le palmitoyl carnitine n'est pas dépendant de CPT-1 pour son transport intramitochondrial, le palmitoyl CoA nécessite d'être lié à la carnitine par CPT-1 pour être ensuite transloqué dans l'espace mitochondrial intermembranaire. L'utilisation de ces 2 types d'AGLC permet donc de préciser l'étape du transport mitochondrial des AGLC faisant l'objet d'une adaptation dans cette situation.

Au cours de l'étude n°2, nous avons mis en évidence une induction spécifique de l'isoforme PPAR- $\delta$  à l'hypoxie ainsi que de ses cibles. Pour savoir si celles-ci peuvent-être impliquées dans la modulation d'affinité pour le palmitoyl carnitine observée à l'hypoxie dans l'étude n°1, nous avons voulu juger des effets propres de PPAR- $\delta$  sur l'utilisation spécifique du palmitoyl carnitine par la mitochondrie.

De plus, l'entraînement en endurance a été décrit comme une situation potentialisatrice des effets métaboliques d'un agoniste PPAR- $\delta$  (Narkar, et coll., 2008). Si cette étude a montré que la performance en endurance était accrue par une telle association, et qu'il existait une signature transcriptionnelle spécifique, les conséquences fonctionnelles sur le métabolisme des AG sont en grande partie inconnues. Seraient-elles responsables de l'amélioration de la performance observée ?

## II. Objectifs

Le premier objectif de ce travail a été d'étudier les effets propres de PPAR- $\delta$  sur le transport fonctionnel et l'oxydation des AGLC et de préciser si ces effets étaient spécifiques des AG ou au contraire commun à tout substrat.

Le second objectif était d'étudier le caractère limitant ou pas du transport CPT-1 dans les situations d'hypoxie chronique et d'entraînement en endurance et d'évaluer les effets d'une activation de PPAR- $\delta$  combinée à ces situations.

## III. Plan expérimental

Nous avons traité des rats par un agoniste pharmacologique de PPAR- $\delta$ , le GW 742, associé ou non à un entraînement en endurance, avec une exposition ou non à l'hypoxie.

Les conséquences sur le métabolisme des AG ont été étudiées par deux approches. En premier lieu, un abord réalisé *in situ* sur fibres perméabilisées en comparant l'oxydation d'un AGLC dépendant du transport CPT-1 à l'oxydation d'un AGLC indépendant de cette étape pour son transport mitochondrial. Ensuite, une approche *in vivo* évaluant une performance aérobie sous maximale, dont on sait qu'elle est influencée par les capacités d'oxydation des AG.

Le plan expérimental retenu consiste en un double carré latin, associant les conditions d'entraînement et de traitement par GW 742 en normoxie ou en hypoxie à 3200 mètres. Huit groupes de femelles wistar (n=8 femelles/ groupe) ont été constitués comme suit :

- Un groupe sédentaire normoxique,
- Un groupe entraîné normoxique,
- Un groupe sédentaire traité au GW 742 normoxique,
- Un groupe entraîné traité au GW 742 normoxique,
- Un groupe sédentaire hypoxique,
- Un groupe entraîné hypoxique,
- Un groupe sédentaire traité au GW 742 hypoxique,
- Un groupe entraîné traité au GW 742 hypoxique.

Même si l'hypoxie est ici moins sévère que dans nos études précédentes, pour éviter tout retentissement d'un déséquilibre de la balance énergétique, nous avons préalablement vérifié qu'après une semaine d'exposition à cette altitude, la courbe de croissance des animaux hypoxiques était identique à celle des animaux normoxiques. Aussi, pour les groupes hypoxiques, nous avons ajouté une semaine de « préconditionnement » hypoxique afin que chaque animal débute le conditionnement avec une balance énergétique équilibrée.

L'entraînement aérobie a été conduit avec 5 séances par semaine, pendant 5 semaines d'après le protocole décrit dans la partie « matériels et méthodes ». L'intensité absolue a été adaptée à l'environnement dans lequel l'exercice est réalisé, afin de garantir la même intensité relative de celui-ci.

Les animaux ont été traités par gavage quotidiennement durant les 3 dernières semaines de conditionnement, soit avec la molécule soit avec un placebo.

L'évaluation de la performance aérobie a été effectuée selon les deux modalités décrites dans la partie « matériels et méthodes ».

Les animaux ont été sacrifiés, après 48 heures de repos et le muscle plantaris prélevé pour la réalisation des mesures de respiration mitochondriale *in situ* avec des protocoles permettant :

- la détermination de l'affinité et des capacités oxydatives maximales pour le palmitoyl carnitine par ajout de concentrations croissantes, en présence d'une concentration saturante en ADP.

- la détermination de l'affinité et des capacités oxydatives maximales pour le palmitoyl CoA par ajout de concentrations croissantes, en présence d'une concentration saturante en ADP.

- la détermination des capacités oxydatives maximales en l'absence d'acides gras, par ajouts successifs de pyruvate, de glutamate et de succinate, en présence d'une concentration saturante en ADP.

- la détermination de la respiration résiduelle à partir du complexe II de la chaîne respiratoire, après inhibition du complexe I par l'amytal.

L'analyse statistique est une analyse de variance à trois voies avec trois conditions : le niveau d'entraînement (sédentaire ou entraîné), le traitement (molécule ou placebo) et

l'environnement (normoxie ou hypoxie). Les comparaisons deux à deux pertinentes, ont été réalisées avec un test de Newman-Keuls.

## IV. Résultats

### *A. Morphologie et biochimie plasmatique*

#### 1. Composition corporelle

Le poids corporel des animaux traités au GW 742 est globalement inférieur au poids corporel des animaux non traités (Tableau 5 : -7% chez les animaux sédentaires traités et -4% chez les animaux entraînés traités). Par contre à une altitude simulée de 3200m, chez des femelles, on n'observe pas de diminution significative du poids corporel comparativement aux animaux maintenus en normoxie. Ceci justifie ici l'absence de groupe apparié en prise alimentaire dans le plan expérimental. Par ailleurs, il n'existe pas non plus de majoration de la perte de poids que le traitement par le GW 742 soit associé à l'exposition à l'hypoxie et/ou à l'entraînement. Ce poids corporel moindre sous GW 742 ne retentit pas sur la croissance corporelle, comme le montre la longueur du tibia inchangée. Cette perte de poids se fait essentiellement au dépend de la masse grasse viscérale avec une diminution de 28% sous l'effet du traitement et indépendamment du statut d'entraînement des animaux. Cette différence sur la masse grasse rétro-péritonéale observée sous GW 742 est du même ordre de grandeur que ce l'on observe sous l'effet propre de l'entraînement en endurance (-25%,  $P < 0,01$ ).

#### 2. Biochimie plasmatique de repos

On retrouve l'élévation classiquement décrite de l'hématocrite sous l'effet de l'hypoxie et ce quelque soit les autres conditions associées à l'hypoxie (Tableau 5).

Le GW 742 diminue de moitié la concentration en AGL plasmatiques aussi bien dans les groupes sédentaires que dans les groupes entraînés. Par ailleurs, l'entraînement par lui-même diminue aussi la concentration en AGL de façon comparable dans les groupes traités et non traités au GW 742 (-38% chez les non traités vs -34% chez les traités). Il n'existe donc pas

d'effets additifs de l'entraînement et du GW 742 sur la concentration en AGL plasmatiques au repos.

Cependant cette diminution des AGL de repos sous GW 742 ne s'accompagne pas d'une amélioration du bilan lipidique avec même une élévation des TG plasmatiques d'environ 30% comparativement aux animaux non traités. On ne retrouve par ailleurs, aucune variation significative de la glycémie de repos entre groupes.

	Sédentaires		Sédentaires GW 742		Entraînés		Entraînés GW 742		Effet global
	N	H	N	H	N	H	N	H	
Poids corporel (g)	226±7	219±4	206±6	206±3	223±5	222 ±5	218± 8	210 ± 6	effet GW 742 $P < 0,005$
Longueur du tibia (mm)	36,7± 0,5	37,4±0,9	36,0±0,5	35,9±0,6	35,8±0,7	36,2±0,6	34,8±1,2	36,4±0,4	
Masse grasse rétropéritonéale/100g poids corporel (g)	1,04±0,18	0,80±0,13	0,73±0,10	0,59±0,05	0,70±0,11	0,68±0,08	0,46±0,06	0,53±0,09	effet GW 742 $P < 0,005$ effet entraînement $P < 0,01$
Hématocrite (%)	37±1	46±1 \$\$\$	40±1	43±1 \$	39±0	46±1 \$\$\$	37±2	45±1 \$\$\$	
AGL (µM)	116±18	136±22	42±7 §	80±20	62±12	94±15	49±9	31±6	effet GW 742 $P < 0,005$ effet entraînement $P < 0,01$
Cholestérol total (mM)	1,0±0,1	1,3±0,1	1,5±0,1 §§	1,6±0,1	1,2±0,1 *	1,1±0,1	1,2±0,1	1,3±0,1	
Triglycérides(mM)	1,2±0,1	1,0±0,1	1,4±0,2	1,5±0,1	1,1±0,2	1,1±0,1	1,2±0,1	1,6±0,1	effet GW 742 $P < 0,005$
Glycémie (mM)	8,5±0,4	9,2±0,3	8,3±0,2	8,8±0,3	8,9±0,2	9,1±0,2	8,7±0,8	8,8±0,4	

**Tableau 5 :** données morphologiques et dosages plasmatiques de repos

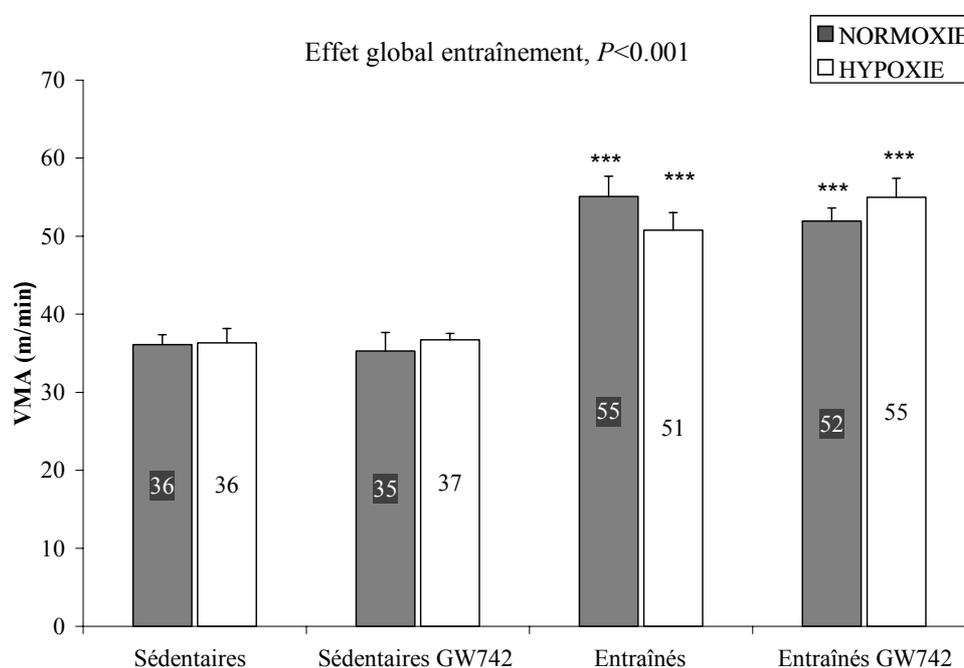
*Les données sont exprimées sous la forme moyenne ± esm*

*Différents des non traités §  $P < 0,05$  §§  $P < 0,01$  §§§  $P < 0,005$  - Différents des Sédentaires \*  $P < 0,05$  - Différents des normoxiques \$  $P < 0,05$  \$\$\$  $P < 0,001$*

## B. Performance

### 1. Vitesse maximale aérobie (VMA)

L'amélioration attendue de la VMA sous l'effet de l'entraînement est retrouvée de façon nette (+48 %,  $P < 0,001$ ) et sans aucune influence du traitement par GW 742 ou de l'exposition à l'hypoxie (Figure 51).



**Figure 51** : évolution de VMA

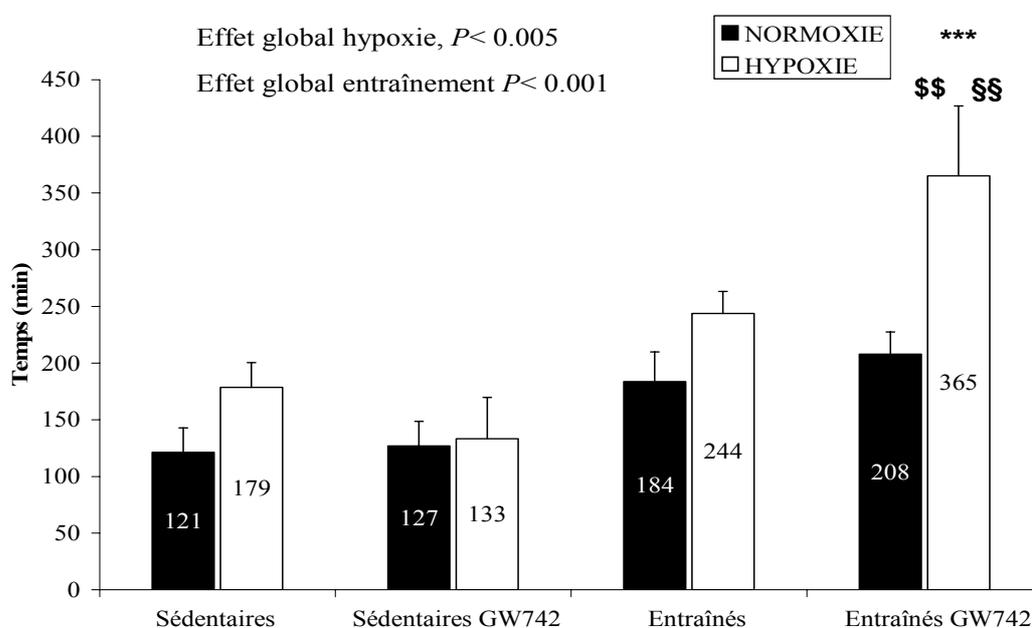
*Les données sont exprimées sous la forme moyenne  $\pm$  esm*

*Différents des sédentaires \*\*\*  $P < 0,001$*

### 2. Temps limite

La Figure 52 montre que le temps de course jusqu'à épuisement, réalisé à 65% de la VMA, est globalement amélioré par l'entraînement (+78%,  $P < 0,001$ ) mais aussi par l'exposition à l'hypoxie (+ 44%,  $P < 0,005$ ). Par contre le GW 742 n'améliore le temps limite que lorsqu'il est associé à l'entraînement conduit en hypoxie, mais de façon alors notable. L'endurance de ce groupe est d'ailleurs significativement différente de tous les autres groupes, avec lesquels

la comparaison est licite ; bien sûr comparativement aux animaux hypoxiques sédentaires traités, mais aussi, contre les animaux entraînés en normoxie et traités, ou encore contre les animaux entraînés en hypoxie mais non traités (+50%,  $P < 0,005$ ).



**Figure 52** : temps limite de course à 65% de la VMA

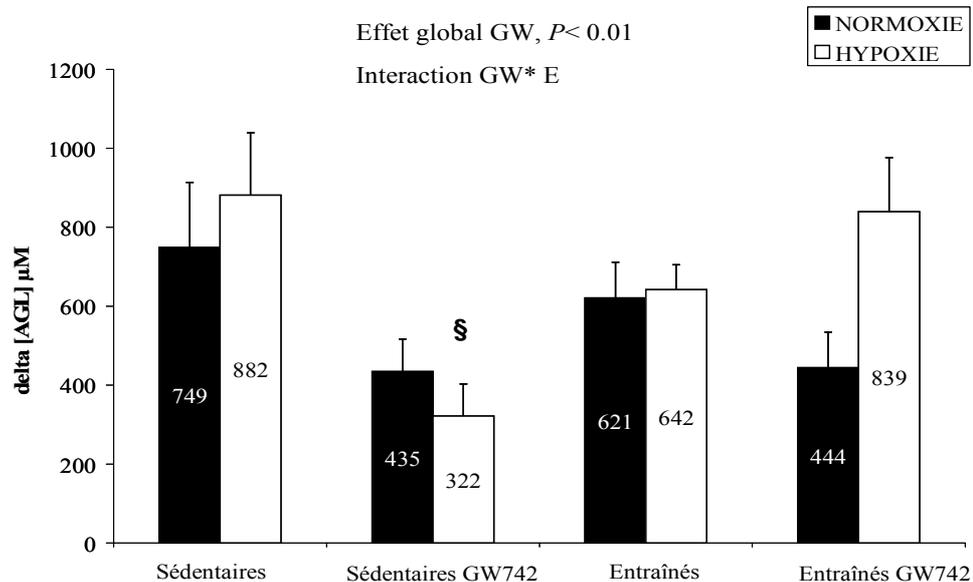
Les données sont exprimées sous la forme moyenne  $\pm$  esm

Différents des sédentaires \*\*\*  $P < 0,001$  - Différents des non traités §§  $P < 0,005$  -

Différents des normoxiques \$\$  $P < 0,005$

### 3. Biochimie à l'arrêt de l'exercice

Pour s'affranchir des valeurs de repos des concentrations en AGL plasmatiques significativement différentes entre les animaux traités et non traités, nous avons choisi de présenter la différence entre les valeurs post temps limite et les valeurs de repos plutôt que les valeurs brutes. Ainsi, on observe globalement une élévation du taux d'AGL de 115% supérieure chez les animaux non traités comparativement aux animaux traités au GW 742 mais uniquement pour les groupes sédentaires (Figure 53).



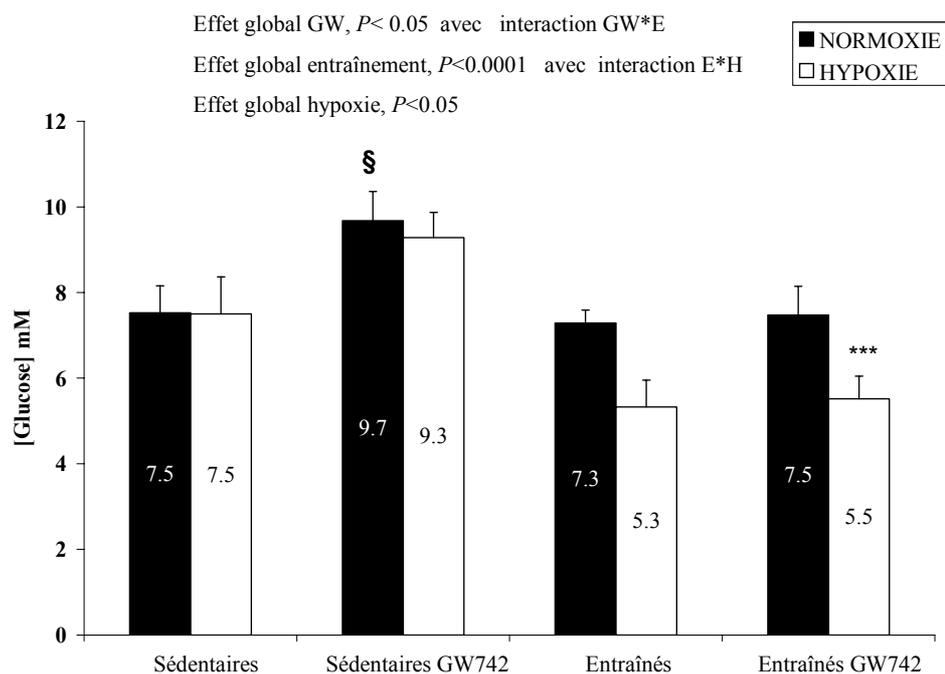
**Figure 53** : différence de concentration en AGL entre la fin du temps limite de course à 65% de la VMA et les valeurs de repos

*Les données sont exprimées sous la forme moyenne  $\pm$  esm*

*Différents des non traités §  $P < 0,05$*

Par contre, les valeurs de glycémie apparaissent significativement plus élevées chez les animaux sédentaires traités, comparés aux animaux non traités (+ 26%,  $P < 0,05$ ), alors qu'il n'apparaît pas de différence significative entre ces deux groupes au repos. Il existe également une glycémie plus basse chez les animaux entraînés par rapport aux animaux sédentaires, mais uniquement dans les groupes hypoxiques (-36%,  $P < 0,05$ ).

On observe ainsi une image en miroir chez les animaux sédentaires traités au GW 742 et les animaux non traités entre les taux d'AGL et la glycémie post temps limite (Figure 54).



**Figure 54** : glycémie à la fin du temps limite de course à 65% de la VMA

*Les données sont exprimées sous la forme moyenne  $\pm$  esm*

*Différents des non traités §  $P < 0,05$  - Différents des sédentaires \*\*\*  $P < 0,001$*

### C. Adaptations quantitatives mitochondriales

#### 1. Capacités oxydatives globales

##### 1.1 Métabolisme basal

Le métabolisme basal mesuré en pyruvate (Tableau 6) est augmenté par l'entraînement mais uniquement dans les groupes maintenus en normoxie (+25%,  $P < 0,05$ ). En effet, on note un effet propre de l'hypoxie (+26%,  $P < 0,05$ ) qui augmente le métabolisme basal chez les sédentaires, mais sans réponse accrue lors de l'association à l'entraînement.

##### 1.2 Métabolisme maximal

###### a) Activité citrate synthase

Il existe, après entraînement, une augmentation de l'activité citrate synthase (CS), considérée comme un reflet des capacités oxydatives globales et ce, quelque soit l'environnement et/ou la prise de GW 742 (Tableau 6).

Néanmoins, il existe une diminution globale des capacités oxydatives dans tous les groupes hypoxiques. Outre cet effet propre de l'hypoxie, on observe aussi une moindre réponse à l'entraînement de la CS dans les groupes entraînés en hypoxie (+27%,  $P < 0,001$ ) versus les groupes entraînés en normoxie (+39%,  $P < 0,001$ ).

Le GW 742 ne potentialise absolument pas les effets de l'entraînement sur l'augmentation de l'activité CS. Si l'on ne peut parler d'une véritable action frénatrice du GW 742 sur la réponse à l'entraînement (+32% chez les animaux entraînés en normoxie et traités versus 39% pour les animaux entraînés en normoxie, non traités), on observe cependant une baisse significative de l'activité citrate synthase dans le groupe entraîné en normoxie et traité comparativement au groupe entraîné non traité (respectivement 53 vs 61,  $P < 0,05$ ) pour des valeurs non significativement différentes dans les groupes sédentaires.

#### b) Vmax

Cependant, cette augmentation de l'activité CS n'est pas retrouvée de façon significative sur le métabolisme maximal en pyruvate-glutamate-succinate, même si une nette tendance à l'augmentation dans les groupes entraînés en normoxie apparaît (Tableau 6 : +15%, NS), en comparaison des groupes sédentaires. Par contre, l'effet limitant de l'hypoxie sur la réponse à l'entraînement est ici clairement retrouvée sur la Vmax (11,6 dans le groupe entraîné en hypoxie versus 15 dans le groupe entraîné en normoxie,  $P < 0,05$ ), alors qu'il n'existe pas de différence entre l'environnement hypoxique et normoxique chez les animaux sédentaires.

***En résumé, on retrouve ici malgré un conditionnement relativement court ( 5 semaines) par rapport à la durée classique (de 8 à 12 semaines), un effet de l'entraînement sur les capacités oxydatives basales et maximales qui n'est potentialisé ni par le GW 742 ni par l'exposition à l'hypoxie.***

Par ailleurs, ce que l'on observe à l'hypoxie sur le métabolisme basal ne peut correspondre à une augmentation des capacités oxydatives, hypothèse totalement écartée par la baisse de l'activité citrate synthase et l'absence de modulation de la Vmax dans cet environnement. Il pourrait alors s'agir d'un phénomène de découplage mais qui reste à confirmer.

	Sédentaires		Sédentaires GW 742		Entraînés		Entraînés GW 742		Effet global
	N	H	N	H	N	H	N	H	
CS	44,23 ±0,86	34,35 ±1,27\$\$\$	40,28 ±0,66	36,73 ±1,45\$	61,43 ±1,22***	43,44 ±1,42*** \$\$\$	53,01 ±1,93*** §§§	43,06 ±0,95**\$\$\$	effet entraînement, GW et hypoxie $P < 0,0001$
3-HAD	3,45 ±0,19	3,24 ±0,34	3,94 ±0,2	3,73 ±0,24	6,34 ±0,56***	5,35 ±0,51**	5,43 ±0,48**	5,51 ±0,35**	effet entraînement $P < 0,001$
CS/ 3-HAD <sup>1</sup>	0,78 ±0,05	0,95 ±0,1	0,98 ±0,06	1,03 ±0,09	1,04 ±0,09	1,23 ±0,15	0,95 ±0,08	1,3 ±0,05	effet entraînement $P < 0,005$ effet hypoxie $P < 0,005$
$V_{0\text{PYR}}$	2,72 ±0,18	3,17 ±0,21	2,47 ±0,2	3,35 ±0,21	3,08 ±0,19	3,24 ±0,19	3,44 ±0,24*	3,35 ±0,2	effet entraînement $P < 0,05$ effet hypoxie $P < 0,05$
$V_{\text{max pyr-glut-succ}}$	12,48 ±0,93	13,53 ±0,67	13,22 ±1,49	12,93 ±0,89	15,03 ±0,81	11,62 ±0,69 \$	14,8 ±0,66	13,65 ±0,55	

**Tableau 6 :** évolution des capacités oxydatives basales et maximales

Les données sont exprimées sous la forme moyenne  $\pm$  esm. Les activités enzymatiques sont exprimées en UI/g tissu frais - Les vitesses de respiration ( $V_0$  et  $V_{\text{max}}$ ) sont exprimées en  $\mu\text{mole d'O}_2/\text{min/g tissu sec.}$  - Le nombre d'expérience étant de 2 pour chaque animal, avec 7 animaux par condition. - <sup>1</sup> rapport multiplié par un facteur 10

Différents des sédentaires \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$  - Différents des non traités §§§ $P < 0,001$  - Différents des normoxiques \$ $P < 0,05$  \$\$\$ $P < 0,001$

## 2. Capacités oxydatives pour le pyruvate

En normoxie, la  $V_{max}$  pyruvate est significativement augmentée par l'entraînement (Tableau 7 : +31%,  $P < 0,005$ ) ce qui est cohérent avec l'augmentation des capacités oxydatives globales. Comme pour la  $V_{max}$  glutamate-succinate, l'effet de l'entraînement sur la respiration en pyruvate est limité par l'exposition conjointe à l'hypoxie. Enfin l'administration de GW 742 limite également l'effet de l'entraînement sur la l'oxydation maximale en pyruvate (+4%, NS) alors que la molécule n'altère pas l'effet de l'entraînement sur la  $V_{max}$  tous substrats (+12%, NS).

## 3. Capacités à oxyder les AGLC

L'activité maximale de la 3-HAD, enzyme limitante de la  $\beta$ oxydation, est augmentée sous l'effet de l'entraînement quelque soit l'environnement et/ou la prise de GW 742 (Tableau 6 : +62%,  $p < 0,001$ ).

Cependant, cette augmentation n'est retrouvée ni sur les capacités oxydatives maximales en PC ni sur les capacités oxydatives maximales en PCoA (Tableau 7).

Par contre, il existe un effet propre du GW 742 qui augmente les capacités oxydatives maximales en PC (+24%,  $P < 0,001$ ) comparativement aux animaux non traités. Le même effet est retrouvé en PCoA mais de façon moins prononcée (+16%,  $P < 0,01$ ).

Il existe par ailleurs une limitation des capacités oxydatives maximales en PCoA après exposition à l'hypoxie (-12% versus les animaux normoxiques,  $P < 0,05$ ) sauf dans le groupe entraîné en hypoxie.

## 4. Evolution relative entre capacités oxydatives maximales globales et spécifiques pour chaque substrat

Si l'augmentation de l'activité 3-HAD à l'entraînement est en partie expliquée par une augmentation de la population mitochondriale, il existe probablement un effet propre de l'entraînement sur la 3-HAD. En effet, si l'on compare l'augmentation de l'activité 3-HAD à l'entraînement qui est de 62% à l'augmentation de l'activité CS qui n'est que de 30%, ceci suggère fortement un effet spécifique de l'entraînement sur la voie de la  $\beta$ -oxydation comparativement à l'effet aspécifique sur le cycle de Krebs.

Par ailleurs, l'oxydation maximale du PC représente une part globalement un peu plus importante des capacités oxydatives maximales chez les animaux entraînés et traités au GW 742 comparativement aux animaux entraînés (19,5% au lieu de 15,5% chez les entraînés non traités,  $P < 0,01$ ). Cet effet du GW 742 n'est retrouvé que dans le groupe entraîné et non chez les animaux sédentaires, le GW 742 rétablissant un niveau relatif d'oxydation en PC chez les animaux entraînés comparable à celui des sédentaires et donc en adéquation avec l'augmentation des capacités oxydatives globales à l'entraînement. Néanmoins, aucun effet du GW 742 n'est retrouvé sur le niveau relatif d'oxydation maximale en PCoA (Tableau 7).

Par contre, il existe une altération globale de la part relative représentée par l'oxydation du pyruvate sous GW 742 d'autant plus marquée qu'on y associe un entraînement en normoxie (-15% chez les entraînés  $P < 0,05$  contre -5%, NS seulement chez les sédentaires). Aussi le GW 742 semble proportionnellement limiter l'augmentation de la respiration en pyruvate par rapport à l'augmentation des capacités oxydatives globales induites par l'entraînement.

	Sédentaires		Sédentaires GW 742		Entraînés		Entraînés GW 742		Effet global
	N	H	N	H	N	H	N	H	
$V_{\max}$ PYR	8,74±0,40	9,38±0,45	9,04±0,66	8,46±0,38	11,35±0,64**	7,97±0,41\$\$	9,40±0,46§§§	10,06±0,43	effet entraînement $P<0,05$ interaction E*GW interaction E*Hx
$V_{\max}$ PC	2,18 ±0,21	2,21 ±0,22	2,83 ±0,21	2,14 ±0,16	1,95 ±0,16	2,14 ±0,21	2,68 ±0,29	2,8 ±0,25	effet GW 742 $P<0,001$
$V_{\max}$ PCoA	2,61 ±0,17	2,29 ±0,18	2,81 ±0,23	2,37 ±0,22	2,38 ±0,14	1,99 ±0,17	2,79 ±0,24	2,80 ±0,34	effet GW 742 $P<0,01$ effet hypoxie $P<0,05$
$V_{\max}$ PYR/ $V_{\max}$ en %	69,9±2,6	67,6±1,8	66,4±2,1	64,3±1,7	74,6±2,5	69,3±2,3	63,2±3,2§	73,9±2,0 \$	effet GW 742 $P<0,05$ interaction Hx*GW
$V_{\max}$ PC/ $V_{\max}$ en %	18,8±2,2	16,6±1,7	22,2±1,7	18,0±1,7	12,8±1,4	18,1±2,1	17,9±2,1	21,0±1,9	effet GW 742 $P<0,01$ interaction GW*E
$V_{\max}$ PCoA/ $V_{\max}$ en %	21,8±2,3	18,2±1,3	21,4±1,3	20,4±2,0	18,2±1,7	17,2±1,8	18,9±2,1	20,6±2,3	

**Tableau 7 :** évolution des capacités oxydatives absolues et relatives spécifiques pour le pyruvate et les AGLC

Les données sont exprimées sous la forme moyenne  $\pm$  esm. Les vitesses de respiration ( $V_0$  et  $V_{\max}$ ) sont exprimées en  $\mu$ mole d'O<sub>2</sub>/min/g tissu sec. Le nombre d'expérience étant de 2 pour chaque chaque animal avec 7 animaux par condition.

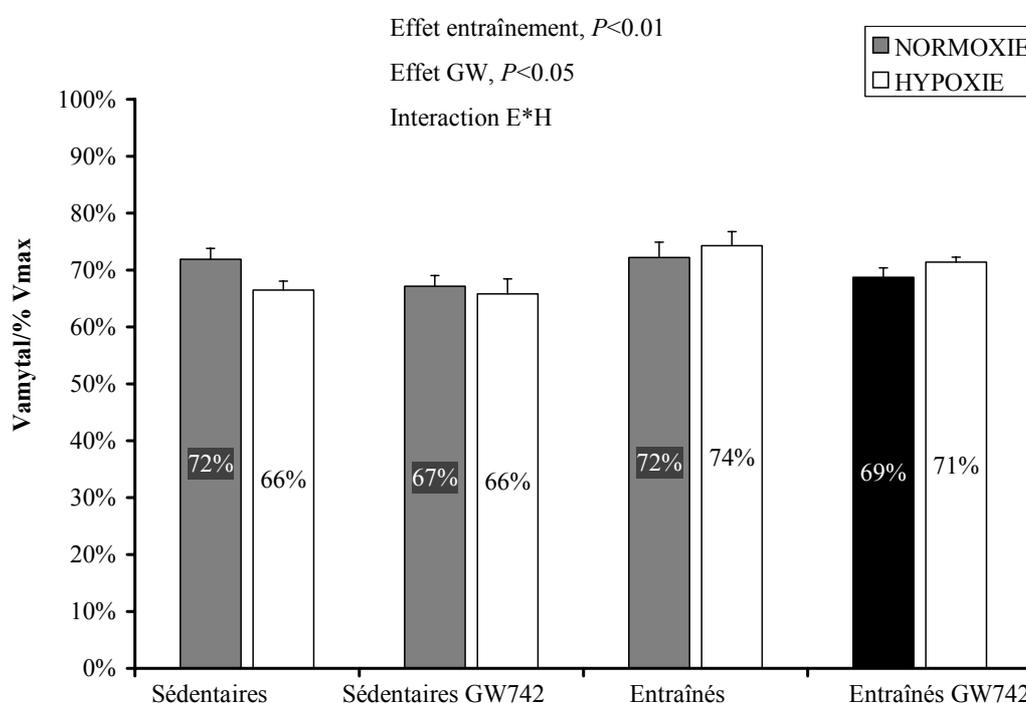
Différent des sédentaires \*\*  $P<0,005$  - Différent des non traités §  $P<0,05$  §§§  $P<0,001$  - Différents des normoxiques \$  $P<0,05$  \$\$  $P<0,01$

## D. Adaptations qualitatives mitochondriales

### 1. Chaîne respiratoire

On observe une discrète augmentation de la respiration résiduelle après inhibition du complexe I par l'amytal (Figure 55), sous l'effet de l'entraînement, uniquement lorsque celui-ci est conduit en hypoxie. Ceci traduit une efficacité accrue du complexe II à l'entraînement en hypoxie (+ 7%,  $P < 0,01$ ).

Au contraire, il existe une altération constante mais d'à peine 3% de la fonctionnalité du complexe II sous GW 742, non corrigée par l'entraînement et/ou l'hypoxie.



**Figure 55** : respiration résiduelle du complexe II après inhibition du complexe I par l'amytal

*Les données sont exprimées (moyenne  $\pm$  esm) et normalisées en % de Vmax*

*« pyruvate+glutamate+succinate »*

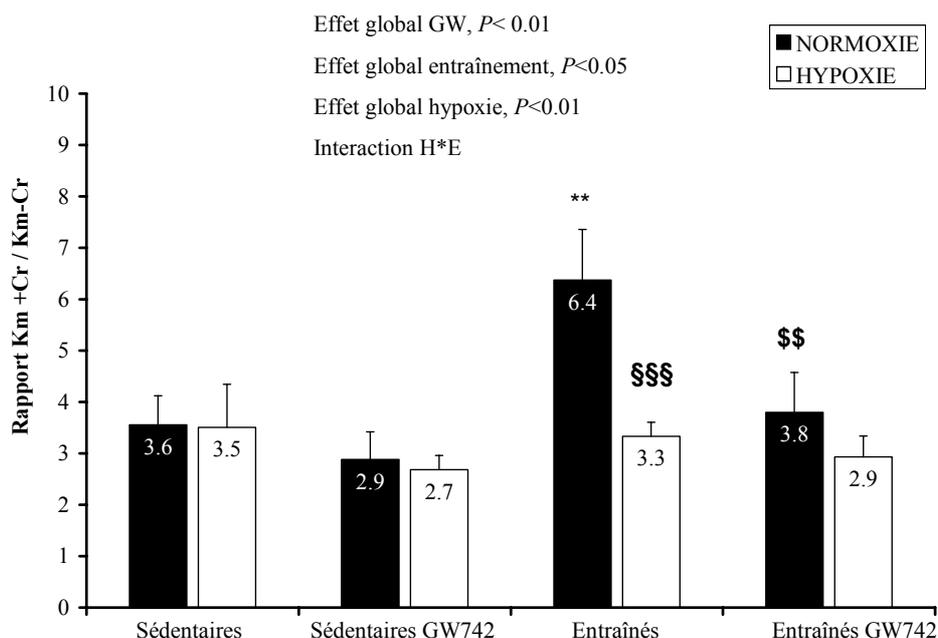
### 2. Efficacité du système des créatine kinases mitochondriales

L'augmentation du rapport des Km pour l'ADP en présence et en l'absence de créatine dans le groupe entraîné en normoxie non traité traduit une amélioration de l'efficacité du système des créatine kinases mitochondriales avec l'entraînement (Figure 56). Cependant l'effet de

l'entraînement est aboli par l'exposition conjointe à l'hypoxie, aussi bien que par le traitement au GW 742.

Ainsi, l'exposition à l'hypoxie pourrait altérer l'adaptation du phénotype métabolique lié à l'entraînement.

De même l'effet global du GW 742 persistant dans le groupe entraîné en normoxie, exclut toute adaptation majeure du phénotype métabolique sous l'effet de cette molécule.



**Figure 56 : efficacité du système créatine kinase**

Les données sont exprimées en valeurs arbitraires (moyenne ± esm)

*Différents des sédentaires* \*\*  $P < 0,005$

*Différents des non traités* §§§  $P < 0,001$

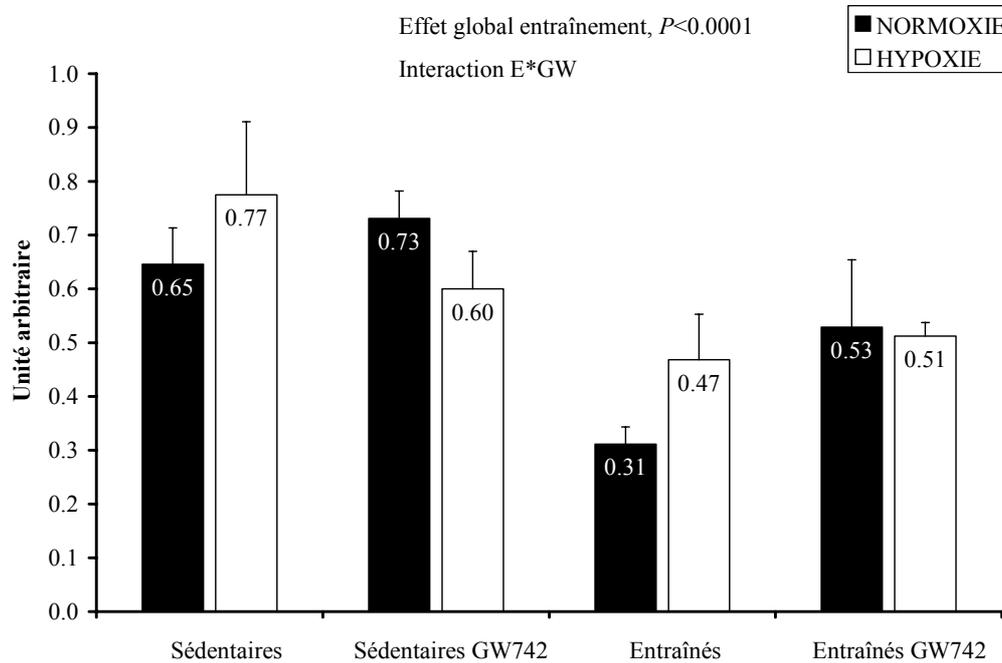
*Différents des normoxiques* §§  $P < 0,005$

### 3. Facteur limitant de l'oxydation des AGLC

#### 3.1 Quid du transport des AGLC dans la mitochondrie ?

Le rapport  $V_{max} \text{ PC}/3\text{-HAD}$  permet d'évaluer le retentissement fonctionnel concret des adaptations enzymatiques quantitatives mesurées ci-dessus. Ainsi, la diminution de ce rapport dans le groupe entraîné non traité (-45%,  $P < 0,0001$ ) est évocatrice d'une limitation du transport du PC qui ne s'adapte pas autant ou pas aussi rapidement, que la voie enzymatique de la  $\beta$ -oxydation en réponse à l'entraînement aérobie. Par contre, cette limitation du transport

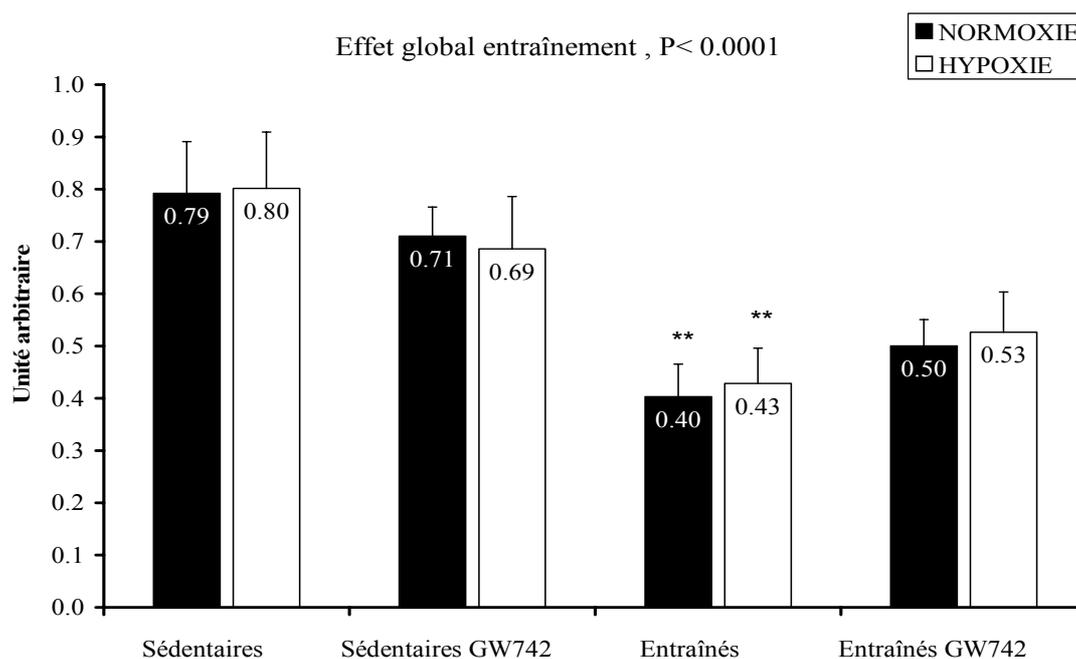
du PC est en partie compensée par le traitement GW 742 qui permet de maintenir un rapport sensiblement identique à celui des groupes sédentaires (Figure 57).



**Figure 57** :. capacités oxydatives maximales en PC rapportées à l'activité 3-HAD

*Les données sont exprimées en valeurs arbitraires (moyenne  $\pm$  esm)*

De même, la diminution du rapport  $V_{max} \text{PCoA}/3\text{-HAD}$  de 40% ( $P < 0,0001$ ) à l'entraînement témoigne d'un facteur limitant dans le transport du PCoA qui n'est cette fois pas compensé par l'administration de GW 742 (Figure 58).



**Figure 58** : capacités oxydatives maximales en PCoA rapportées à l'activité 3-HAD

*Les données sont exprimées en valeurs arbitraires (moyenne  $\pm$  esm)*

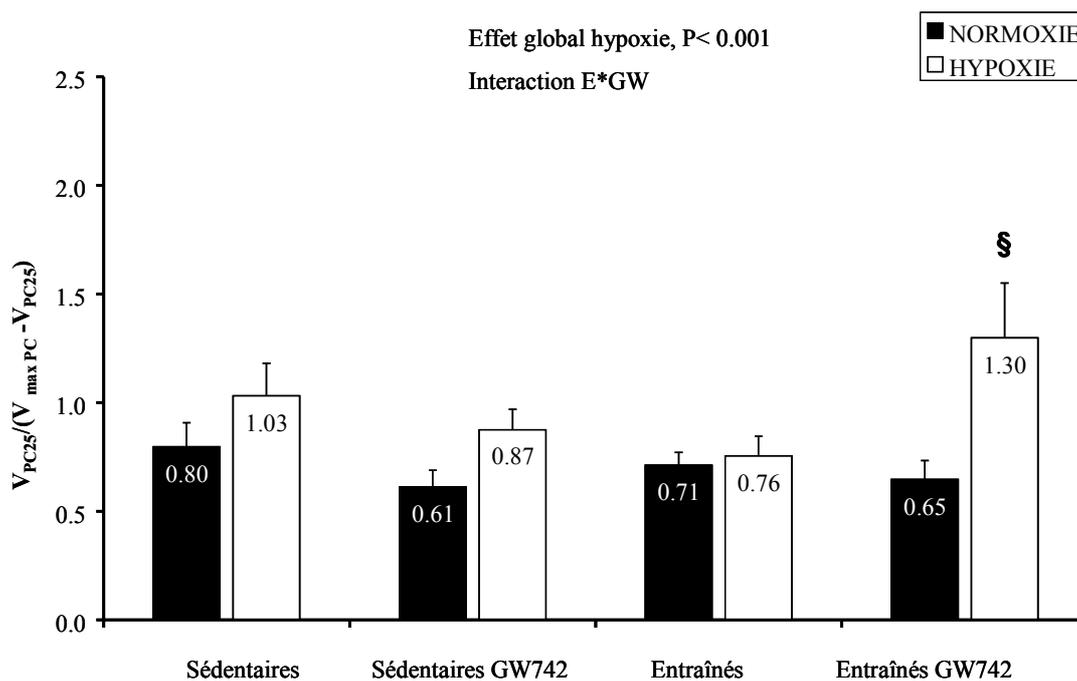
*Différents des sédentaires \*\*  $P < 0,01$*

Si le GW 742 semble améliorer les capacités maximales d'oxydation du PC et du PCoA en valeur absolue, cette molécule ne rétablit l'adéquation entre les capacités mitochondriales de  $\beta$ -oxydation accrues par l'entraînement et l'oxydation des AGLC, que pour le PC mais ne semble pas en mesure de le garantir pour le PCoA, dont le transport resterait encore limitant après entraînement.

### 3.2 Fonctionnalité CPT-2

#### a) Indice de flux du PC

Le rapport  $V_{PC25}/(V_{maxPC} - V_{PC25})$  traduit la facilité à oxyder le PC pour de faibles concentrations de substrat. On retrouve ici, un effet facilitateur propre de l'hypoxie ( $P < 0,001$ ) (Figure 59). Il existe par ailleurs une potentialisation notable de l'effet de GW 742 sur la facilitation du flux sous maximal en PC lorsque l'entraînement est conduit en hypoxie (flux multiplié par 1,7,  $P < 0,05$ ).



**Figure 59** : indice de flux du PC

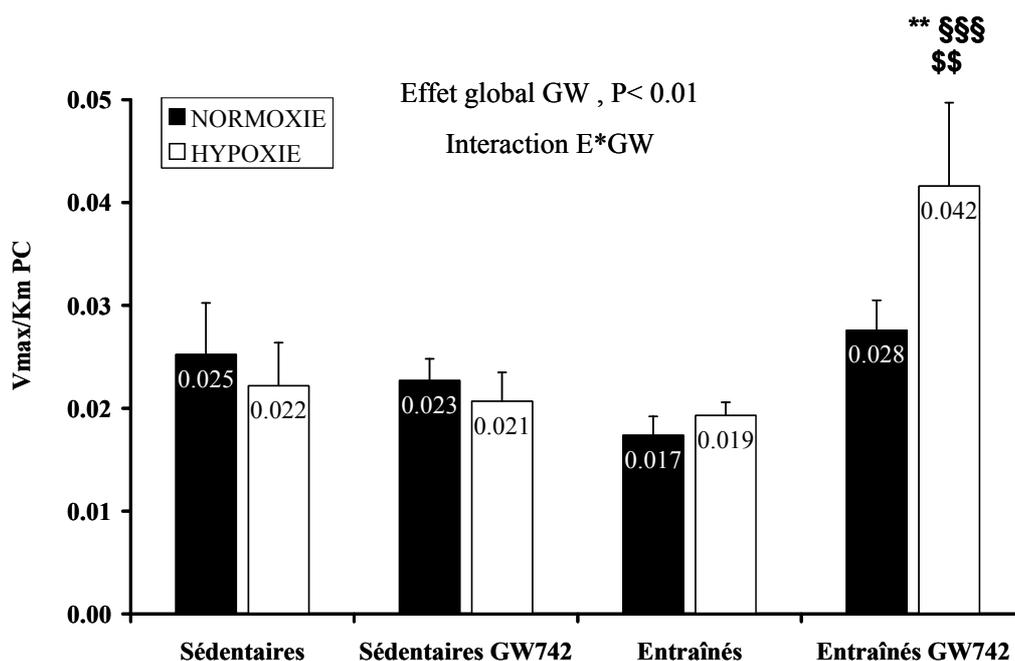
*Les données sont exprimées en valeurs arbitraires (moyenne  $\pm$  esm)*

*Différent des non traités §  $P < 0,05$*

#### b) Efficacité catalytique

Elle correspond à l'expression du rapport  $V_{max}/K_m$  pour chaque animal, et permet de caractériser un système enzymatique ; ces deux grandeurs étant suffisantes pour définir les propriétés fonctionnelles du système en tenant compte à la fois des adaptations intrinsèques, de nature « qualitative » mais aussi des variations liées à la quantité de mitochondries et donc d'enzymes présentes par unité de tissu. Aussi, mieux que l'expression du  $K_m$  brut, toute variation de ce rapport traduit le retentissement fonctionnel des modulations quantitatives et qualitatives du complexe enzymatique.

Le GW augmente l'efficacité catalytique du système CPT-2 de 48 % mais uniquement lorsqu'il est associé à l'entraînement (Figure 60). On observe par ailleurs une potentialisation des effets de l'hypoxie, de l'entraînement et du traitement avec une efficacité catalytique du système CPT-2, augmentée dans le groupe entraîné en hypoxie et traité par rapport à toute association de seulement deux de ces conditions.



**Figure 60** : efficacité catalytique pour le PC

*Les données sont exprimées en valeurs arbitraires (moyenne  $\pm$  esm)*

*Différent des sédentaires \*\*  $P < 0,005$ , Différent des non traités  $\text{\$}\text{\$}\text{\$} P < 0,001$ ,*

*Différents des normoxiques  $\text{\$}\text{\$} P < 0,005$*

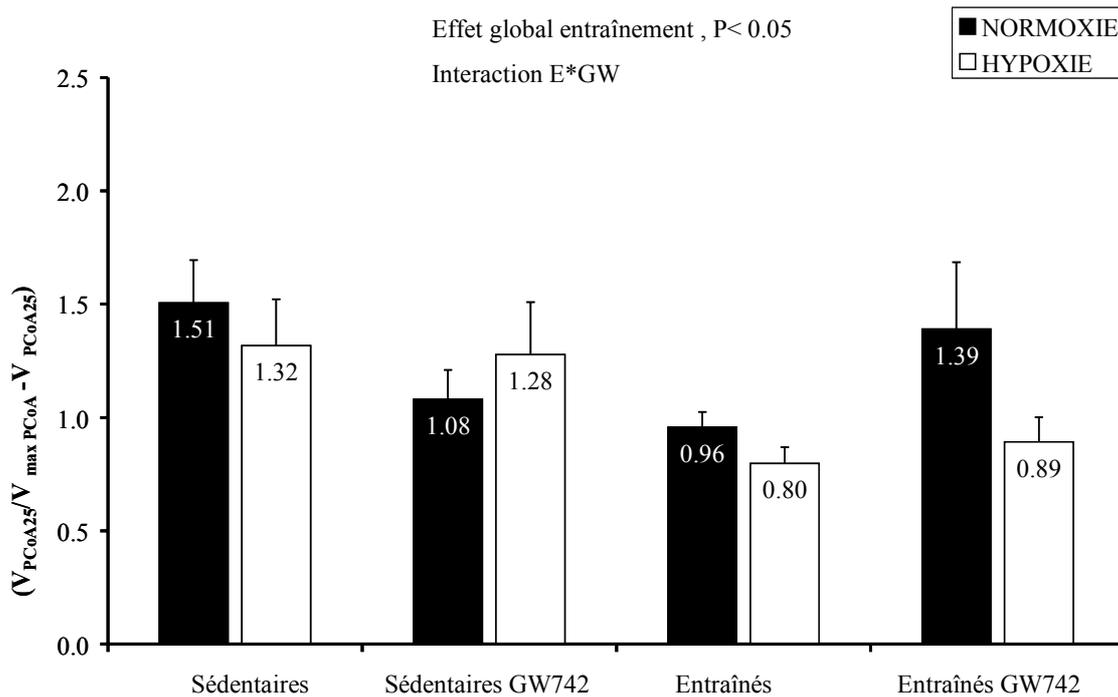
### 3.3 Fonctionnalité CPT-1

#### a) Indice de flux du PCoA

Le même rapport calculé pour le PCoA montre un aspect bien différent avec une altération de ce flux sous-maximal à l'entraînement aussi bien en hypoxie qu'en normoxie (Figure 61).

Par contre, l'effet facilitateur du GW 742 n'est retrouvé qu'à l'entraînement en normoxie, permettant ainsi de rétablir un flux sous maximal en PCoA chez les animaux entraînés.

Alors que le GW 742 et l'hypoxie potentialisent leur effet propre sur le flux en PC, il n'existe pas d'effet du GW 742 sur le flux CPT-1 en hypoxie.



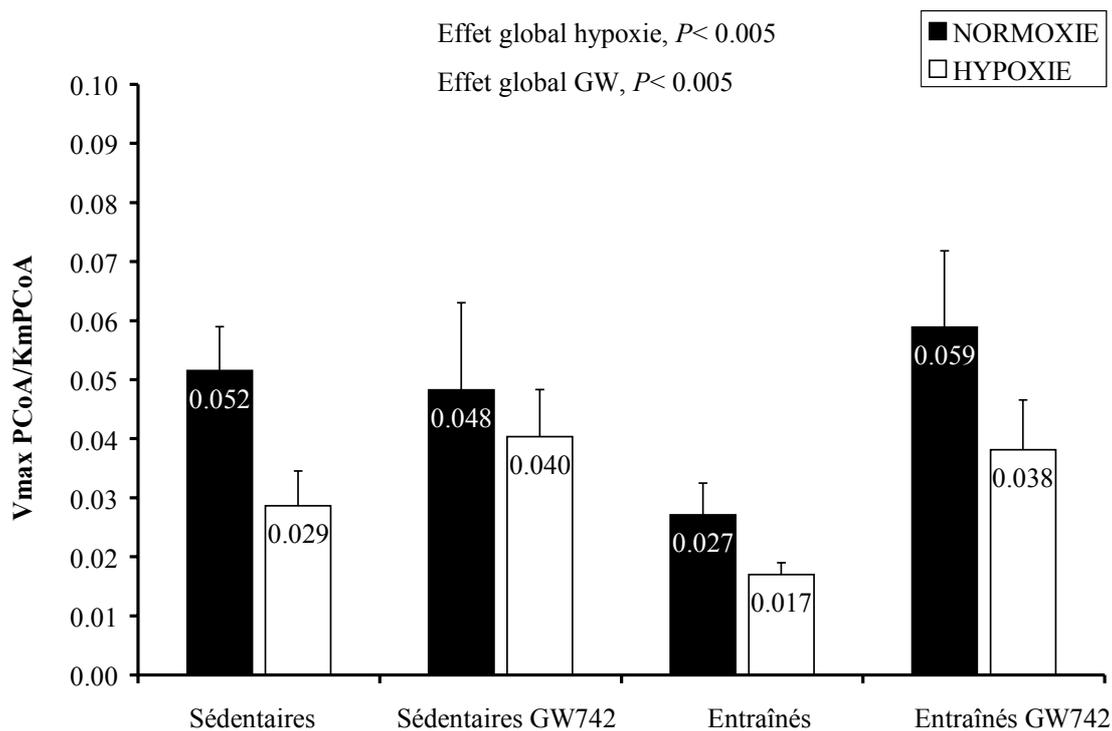
**Figure 61:** indice de flux du PCoA

*Les données sont exprimées en valeurs arbitraires (moyenne  $\pm$  esm)*

#### b) Efficacité catalytique

On retrouve une altération globale de ce rapport par l'hypoxie (-33%,  $P < 0,005$ ) évoquant un frein spécifique sur le transport CPT-1 dans cet environnement (Figure 62). Par ailleurs, il existe un effet propre du traitement par GW 742 qui améliore l'efficacité catalytique du système de transport du PCoA de 49 % ( $P < 0,005$ ) et de 120% si on considère uniquement les groupes entraînés. L'effet du GW 742 associé à l'entraînement est donc plus important sur l'efficacité catalytique du transport CPT-1 que sur celle du transport CPT-2.

Par contre même s'il existe une tendance à la diminution de l'efficacité catalytique lors de l'entraînement, celle-ci n'est pas significative. Ceci suggère qu'une partie de la baisse d'affinité pour le PCoA enregistrée à l'entraînement est limitée par l'augmentation quantitative d'enzymes actives, en partie liée à l'augmentation des capacités oxydatives observée dans cette situation.



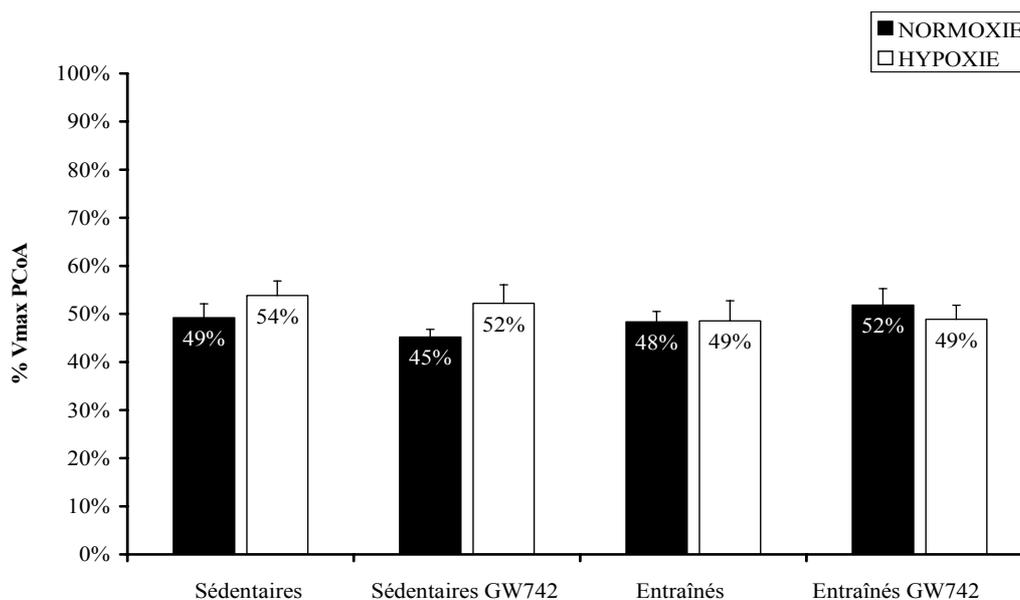
**Figure 62** : efficacité catalytique pour le PCoA

*Les données sont exprimées en valeurs arbitraires (moyenne  $\pm$  esm)*

### c) Part de CPT-1 inhibable par le malonyl-CoA

Le malonyl-CoA étant l'inhibiteur physiologique de CPT-1, nous nous sommes intéressés à la part du transport CPT-1 inhibable par ce régulateur négatif à concentration saturante. Aussi, même une concentration saturante de malonyl-CoA n'inhibe que de 50% la respiration en PCoA (Figure 63). Il n'existe par ailleurs aucune modulation liée à l'entraînement, à l'environnement ou au GW 742 sur la fraction de CPT-1 inhibée par le malonyl-CoA.

Il faut cependant bien noter que cela ne permet pas d'exclure une modulation de la sensibilité au malonyl-CoA, mais seulement de conclure sur l'absence de modulation de l'effet maximal du malonyl-CoA.

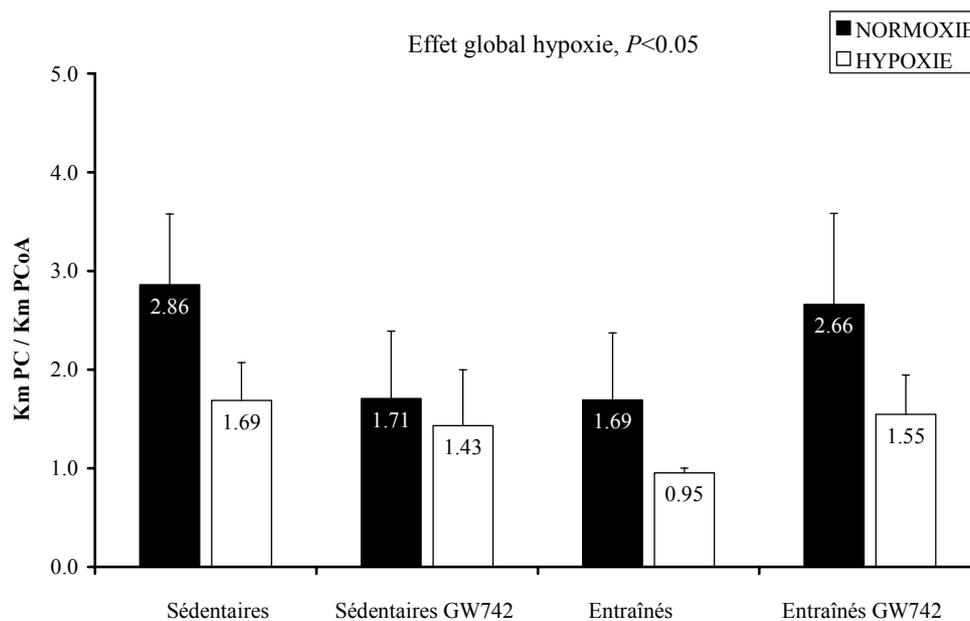


**Figure 63:** respiration résiduelle en PCoA après ajout de malonyl-CoA

*Les données sont exprimées en pourcentage*

#### 3.4 Evolution respective du transport CPT-1 et du transport en aval

Le rapport des Km en PC et PCoA permet d'étudier la facilité relative du transport des AGLC médié par CPT-1 ou indépendant de CPT-1. Ainsi, il apparaît que l'effet facilitateur de l'hypoxie sur le transport du PC ne s'accompagne pas d'une facilitation équivalente sur le transport CPT-1 (Figure 64). La facilitation à oxyder le PC pouvant compenser l'altération du transport CPT-1 ou inversement ce dernier pouvant limiter les effets de la facilitation en PC. La proportion de ces effets potentialisateurs ou frénateurs de l'hypoxie, respectivement, sur la facilité à oxyder le PC ou le PCoA n'est modulée, ni par l'entraînement, ni par le GW 742.



**Figure 64** : efficacité du transport CPT-1

Les données sont exprimées en valeurs arbitraires (moyenne  $\pm$  esm)

### 3.5 Situations limitantes et raisons supposées ?

#### a) Le transport CPT-1, limitant en hypoxie et à l'exercice?

Si l'on transpose les connaissances obtenues *in vivo* sur le métabolisme énergétique systémique au cours de l'exercice à ce qui se passe dans notre chambre de respiration au cours de la cinétique PCoA, on est capable de calculer la consommation d'oxygène correspondant à un exercice conduit à 65% de la consommation maximale d'oxygène. D'après Brooks (Brooks and Mercier, 1994), c'est à cette puissance d'exercice que la part d'énergie fournie par les AG est la plus grande représentant jusqu'à 30% de l'énergie consommée.

Ainsi, on est en mesure de calculer la consommation d'oxygène correspondant à ce niveau d'énergie, et la concentration de PCoA capable de fournir cette consommation d'oxygène.

Il apparaît que même pour les groupes sédentaires, l'environnement hypoxique ne permet pas de fournir cette quantité d'énergie par l'oxydation du PCoA. De plus, on peut observer que dans toutes les situations d'entraînement sauf celle d'entraînement en hypoxie sous GW 742, cette consommation d'oxygène calculée dépasse la consommation d'oxygène atteinte pour une concentration saturante de 400 $\mu$ M de PCoA. On peut alors objectiver, au moins *in situ* une limite à la quantité d'oxygène consommé et donc à l'énergie produite par l'oxydation du PCoA en situation d'exercice (Tableau 8).

La mise en évidence d'une limitation au niveau du transport CPT-1 en situation d'exercice exclut cependant la participation des AGCC dans la fourniture d'énergie, dans notre modèle.

b) Tableau de synthèse

*Les principales adaptations mitochondriales quantitatives et qualitatives sont résumées dans le tableau 9.*

	Sédentaires		Sédentaires GW 742		Entraînés		Entraînés GW 742	
	N	H	N	H	N	H	N	H
30%*65%V <sub>max</sub>	2,4±0,1	2,6±0,1	2,6±0,2	2,5±0,2	2,9±0,2	2,3 ±0,1	2,9± 0,1	2,7 ± 0,1
V <sub>max</sub> PCoA	2,61 ±0,17	2,29 ±0,18	2,81 ±0,23	2,37 ±0,22	2,38 ±0,14	1,99 ±0,17	2,79 ±0,24	2,80 ±0,34
[PCoA] pour laquelle ce niveau de respiration est atteint en µM	250	>>400	250	>400	>>400	>>400	>400	250

**Tableau 8 :** concentration de PCoA minimale pour laquelle est atteint le point représentatif du lipoxmax à l'exercice correspondant à 30% de la fourniture d'énergie à 65% de la consommation maximale d'oxygène.

	Sédentaires		Sédentaires GW 742		Entraînés		Entraînés GW 742	
	N	H	N	H	N	H	N	H
Quantité de mitochondrie	≈	↓	≈	↓	↑	≈	↑	≈
Complexe II de la chaîne respiratoire	≈	≈	≈	≈	≈	↑	≈	↑
Enzyme de cycle de Krebs	≈	↓	≈	↓	↑↑	↑	↑↑	↑
Enzyme de β-oxydation	≈	≈	≈	≈	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑
Flux maximal en pyruvate	≈	≈	↓	↓	≈	↓	↓	≈
Transport CPT-1 maximal	≈	↓	↑	↓	≈	↓	↑	↑
Sous maximal	≈	≈	≈	≈	↓	↓	≈	↓
Transport en aval de CPT-1 maximal	≈	≈	↑	↑	≈	≈	↑	↑
Sous maximal	≈	↑	≈	↑	≈	↑	≈	↑↑

**Tableau 9 :** récapitulatif des niveaux de contrôles de l'oxydation des AGLC et leur caractère limitant

## V. Eléments de discussion

### *A. Caractérisation d'un phénotype de repos sous GW 742*

En fin de conditionnement, le poids globalement plus faible chez les animaux traités est en miroir du phénotype observé chez des souris KO PPAR- $\delta$  qui présentent une diminution du métabolisme basal et de leur thermogénèse (Lee, et coll., 2006). Jucker avait retrouvé une courbe de poids comparable chez des animaux traités à la dose de 100mg/kg/j dans l'alimentation (Jucker, et coll., 2007).

Si la modification de la composition corporelle n'a pas toujours été mise en évidence sous agoniste PPAR- $\delta$  chez des animaux minces, la perte de masse grasse est constamment retrouvée dans des modèles génétiquement obèses (Tanaka, et coll., 2003), ou rendus obèses par un régime hyperlipidique (Harrington, et coll., 2007, Tanaka, et coll., 2003)). Dans une autre étude c'est le contenu en lipide intramusculaire qui est diminué après seulement 7 jours de traitement (Jucker, et coll., 2007).

Dans ces conditions, l'absence d'amélioration du bilan lipidique peut sembler contradictoire. Ainsi, le premier effet suggéré d'un agoniste sélectif PPAR- $\delta$  remonte à 2001, où cette molécule était pressentie comme modulant le transport retour du cholestérol de la périphérie vers le foie en favorisant l'expression de transporteur « High density lipoprotein » (HDL) (Oliver, et coll., 2001). Enfin, la première étude clinique réalisée chez l'homme obèse (Riserus, et coll., 2008) montre qu'après 2 semaines de traitement par un autre agoniste PPAR- $\delta$  le GW 501516, les taux de TG et de LHL-cholestérol sont diminués. Cependant outre la différence d'espèce, le profil métabolique des sujets était perturbé préalablement à l'intervention alors que dans notre cas, il s'agit de jeunes femelles Wistar, spontanément actives, de faible poids corporel, et qui présentent un bilan lipidique normal. De plus, notre dosage ne permettant pas de différencier les différentes formes de transporteurs du cholestérol, l'élévation du cholestérol total pourrait très bien refléter une élévation de la forme HDL-cholestérol.

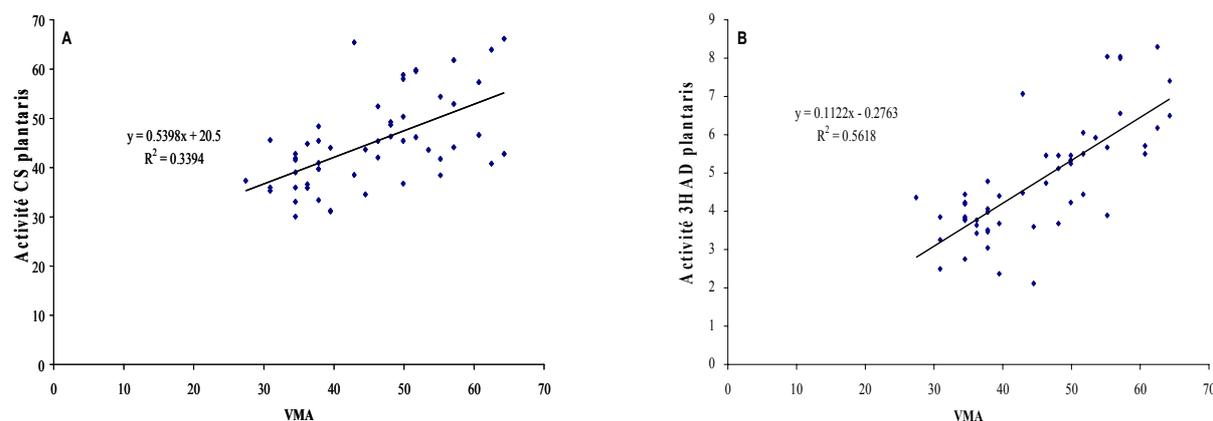
De même, l'absence de modulation de la glycémie observée ici ne consiste pas en une remise en question de l'effet insulinosensibilisateur observé chez des souris (Lee, et coll., 2006, Tanaka, et coll., 2003) ou des hommes obèses qui présentent un moindre hyperinsulinisme (Riserus, et coll., 2008). Cependant, cet effet des agonistes PPAR- $\delta$  fait encore l'objet de

controverse. Ainsi il a même récemment été suggéré une altération du flux de glucose dans tous types de muscles après un tel traitement (Cresser, et coll., 2010). Néanmoins si le muscle est une cible privilégiée des agonistes PPAR- $\delta$ , il n'est pas le seul organe à exprimer cette isoforme assez ubiquitaire. Aussi, Lee et col. avaient noté une réponse insulinique exacerbée sous GW 501516 dans deux autres organes insulino-dépendants avec une diminution de l'efflux de glucose hépatique et une augmentation du stockage des AGL en TG dans les adipocytes (Lee, et coll., 2006). Enfin, il a été récemment montré un effet direct sur les cellules  $\beta$  du pancréas, qui préserverait l'insulinosécrétion en réponse au stimulus glycémique, notamment en limitant la lipotoxicité sur ces cellules pancréatiques très fragiles (Ravnskjaer, et coll., 2010). Si la glycémie mesurée isolément dans nos conditions de sacrifice c'est-à-dire hors condition de jeûne et sans insuliniémie en regard doit être interprétée avec prudence, la diminution des AGL plasmatiques pourrait être cohérente avec une meilleure sensibilité du tissu adipeux à l'insuline et donc à un stockage plus rapide des TG en période postprandiale. Il est pourtant peu probable que ceci joue quelque rôle significatif sur la moindre élévation des AGL plasmatique à l'exercice prolongé, situation où l'insuliniémie est de toute façon effondrée.

## ***B. La performance***

### 1. Capacité aérobie maximale

L'augmentation tout à fait classique de la VMA sous l'effet de l'entraînement est retrouvée ici. Il existe une corrélation positive entre la VMA et des marqueurs des capacités oxydatives globales tant avec l'activité CS qu'avec l'activité 3-HAD (Figures 65). Comme les capacités oxydatives globales ne sont modifiées que par l'entraînement, il est cohérent de ne retrouver, sur ce paramètre, qu'un effet isolé de l'entraînement. Notre équipe avait d'ailleurs déjà montré la corrélation des capacités oxydatives maximales mitochondriales avec la consommation maximale en oxygène sur organisme entier chez des sujets sédentaires et/ou entraînés (Zoll, et coll., 2002).



**Figure 65 :** corrélations « VMA - l'activité CS » (A) et « VMA et l'activité 3-HAD » (B) dans le plantaris.

## 2. Temps limite

L'amélioration du temps d'endurance avec l'entraînement aérobie est très nette dans nos conditions expérimentales, comme largement démontré par le passé. Dans le cas d'entraînement en endurance, l'amélioration du temps de maintien à une puissance de course sous-maximale est communément expliquée par une économie en glucose et une meilleure capacité à utiliser les AG disponibles. Cette hypothèse a été modélisée par le déplacement vers la droite du point de croisement glucido-lipidique sous l'effet de l'entraînement endurant (Brooks and Mercier, 1994). Ceci traduirait, la proportion plus grande d'énergie fournie par les lipides lors de la réalisation d'un exercice calibré à puissance relative donnée sous l'effet de l'entraînement aérobie.

Par contre, l'effet globalement favorable de l'hypoxie est plus inattendu et la littérature ne fournit pas d'hypothèse évidente explicitant cette amélioration de performance. L'augmentation de l'hémoglobine pourrait évidemment participer à l'amélioration des capacités de transport en oxygène montrée ici et utilisée dans toutes les stratégies de «living high» que celui-ci soit associé à une stratégie de type «training low» ou «training high». Plusieurs revues récentes de la littérature s'accordent d'ailleurs à dire que le principal effet des stratégies de «living high» sur la performance réside dans l'élévation du taux d'hémoglobine (de Paula and Niebauer, 2010, Levine and Stray-Gundersen, 2005), raison pour laquelle les expositions trop brèves ou encore à une altitude inférieure à 2500m ne retrouvent pas les effets escomptés.

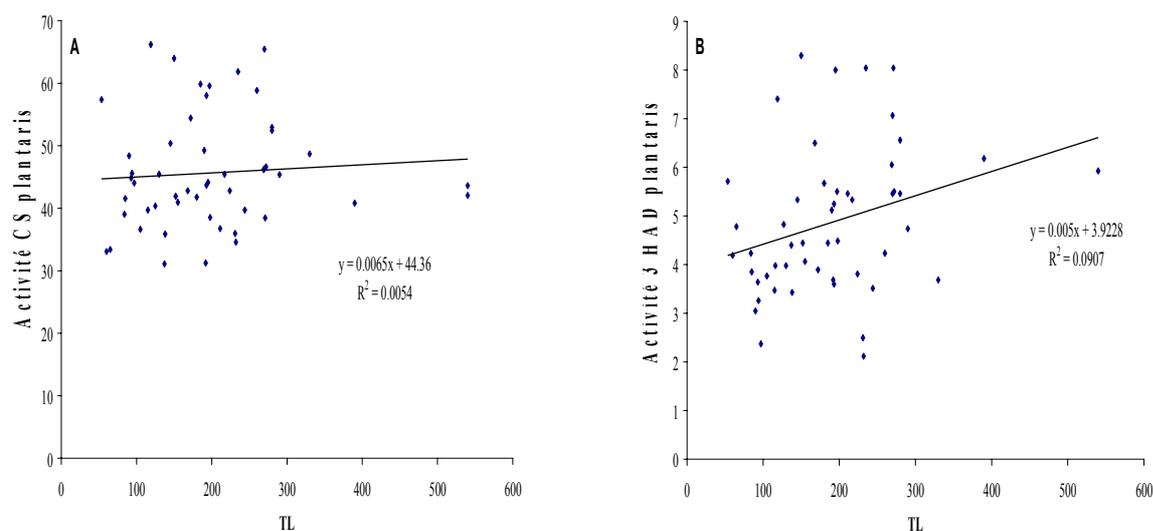
Quant aux effets spécifiques liés à l'entraînement en hypoxie, ces dernières années ont plutôt mis l'accent sur une stratégie de «training high-living low» avec laquelle nos résultats sont difficilement comparables. Le but de ces stratégies étant de s'affranchir des effets éventuellement délétères de l'hypoxie prolongée sur la fonction musculaire et mitochondriale (Hoppeler, et coll., 2003), mais en accentuant le stress de l'exercice et en espérant ainsi exacerber les réponses adaptatives. Or, même dans cette stratégie, très peu d'effets bénéfiques sur la performance mesurée en normoxie ont été retrouvés (Flueck, 2009, Hoppeler, et coll., 2008, Vogt and Hoppeler, 2010). Néanmoins, la plupart du temps, seule la performance aérobie maximale a été évaluée. Dans notre cas, il s'agit bien d'une amélioration de la performance à une intensité très sous-maximale. La seule étude retrouvant une amélioration des capacités d'endurance est celle d'Abdelmalki associant une exposition chronique à 5500m avec un entraînement en endurance en normoxie. Dans cette étude réalisée chez le rongeur, l'amélioration de la performance semblait essentiellement reliée à la perte de poids induite par l'exposition chronique à l'hypoxie secondaire à l'anorexie d'altitude (Abdelmalki, et coll., 1996). Une autre difficulté pour comparer nos résultats à ceux de la littérature (relative aux réponses humaines) réside dans le statut initial des sujets inclus dans les études qui est largement susceptible de modifier la réponse à l'entraînement. Ainsi, Ponsot avait noté, chez des athlètes une amélioration du temps de maintien au 2<sup>o</sup> seuil ventilatoire de 500 à 800 secondes après un entraînement conduit en hypoxie (Ponsot, et coll., 2006). Là encore, outre la différence d'espèce, et de l'état d'entraînement initial de l'échantillon, il s'agit d'une amélioration de la performance à haute puissance. Compte tenu de nos hypothèses et de notre volonté d'étudier le rôle joué par le métabolisme des AG à l'exercice endurant et des facteurs limitants de celui-ci, nous nous sommes volontairement intéressés à un exercice très sous maximal à 65% de la VMA, puissance pour laquelle la contribution des AG à la fourniture d'énergie est la plus importante comparativement à des puissances plus élevées induisant une dépendance au glucose (Brooks and Mercier, 1994).

Quant à l'effet bénéfique du GW 501516, celui-ci n'est retrouvé qu'en hypoxie. Même si le papier princeps et au titre accrocheur de l'équipe d'Evans ne retrouvait en fait l'effet bénéfique de leur agoniste PPAR- $\delta$  que chez les souris entraînées, il n'en reste pas moins que leur entraînement était conduit en normoxie (Narkar, et coll., 2008). Il montrait alors un temps de course doublé chez les souris entraînées et traitées par rapport aux souris simplement

entraînées. Même si l'agoniste utilisé par Narkar et le nôtre sont considérés comme deux activateurs pharmacologiques sélectifs de PPAR- $\delta$ , les molécules utilisées ne sont pas identiques respectivement le GW 501516 et le GW 742. Cependant ces deux molécules ne diffèrent que par le remplacement d'un groupe hydroxyle par un groupe fluoré sur le cycle benzène (Sznajdman, et coll., 2003). Par contre, dans l'étude de Narkar le protocole d'évaluation de la performance n'est malheureusement pas précisé ; il est probable que celui-ci ait été réalisé à intensité de course constante entre les groupes. Or, le recours à une intensité absolue constante n'est certainement pas la modalité la plus pertinente pour examiner le gain en endurance. Néanmoins, si ceci est un biais importante pour la comparaison entre les groupes sédentaires et entraînés compte tenue des VMA très différentes dans ces deux groupes, ceci ne peut avoir modifier de façon sensible les résultats au sein des groupes entraînés, traités ou non, les VMA étant comparables. Nous ne pouvons cependant exclure que l'intensité de course utilisée chez Narkar représente une intensité relative encore plus sous maximale que la nôtre et que nous soyons dans notre étude à une intensité déjà trop élevée pour observer un gain issu d'un métabolisme lipidique plus performant. Enfin, il existe une différence d'espèce souris chez Narkar, versus rat Wistar chez nous. On sait que même au sein d'une espèce, il existe des souches particulièrement propices à la course alors qu'il est quasiment impossible d'en faire courir d'autres.

Nous discuterons plus loin des hypothèses qui sous-tendent cette augmentation de performance, spécifiquement lorsque l'entraînement conduit en hypoxie est associé au GW 742 mais après avoir préalablement discuté des adaptations mitochondriales issues du conditionnement.

*Alors que la VMA semble grandement expliquée par des adaptations quantitatives, l'absence de corrélation entre la performance en temps-limite et les capacités oxydatives globales voire même avec l'activité 3-HAD montrent clairement que les capacités d'endurance ne reposent pas exclusivement sur des adaptations mitochondriales quantitatives (Figure 66).*



**Figure 66** : corrélations « temps limite à 65% de VMA - activité CS » (A) et « temps limite à 65% de VMA - activité 3-HAD » (B) dans le plantaris.

### 3. Evolution en miroir des taux de glucose et d'AGL en fin de temps limite chez les animaux traités

Alors que dans les groupes non traités, l'exercice s'accompagne d'une nette baisse de la glycémie avec une élévation importante des AGL par rapport aux valeurs de repos, nous retrouvons dans les groupes traités une glycémie peu modifiée voire augmentée et une moindre augmentation des AGL. L'effet inverse avait été retrouvé chez des souris KO PPAR- $\alpha$  avec un épuisement plus précoce à l'exercice et une augmentation de la déplétion glycogénique hépatique (Muoio, et coll., 2002). Par contre, dans cette étude, la réponse métabolique musculaire semblait préservée avec une déplétion glycogénique et une induction transcriptionnelle de PDK-4 et d'UCP-3 de même niveau que chez les souris sauvages. Les auteurs, suggéraient comme explication, la suppléance dans le muscle de la fonction PPAR- $\alpha$ , par le gène PPAR- $\delta$ , 10 fois plus exprimé dans le muscle squelettique que la forme  $\alpha$ . L'effet systémique ici observé en fin de temps limite pourrait donc être lié à un effet hépatique induit par une activation PPAR- $\alpha$  sous GW 742. En effet, même si la dose de 30mg/kg/j utilisée dans notre étude est loin des doses pour lesquelles un effet toxique hépatique a été décrit (Faiola, et coll., 2007), on ne peut exclure un effet activateur sur PPAR- $\alpha$ . En effet, alors que la sélectivité d'activation PPAR- $\delta$  est garantie aux très faibles doses,

celle-ci diminue avec l'augmentation de la dose. Même pour une dose modérée dans notre étude, une hépatomégalie a constamment été observée chez les animaux traités suggérant qu'un effet PPAR- $\alpha$  pourrait exister.

Aussi, même s'il est tentant d'interpréter cette évolution en miroir des taux de glucose et d'AGL plasmatiques comme une épargne de glucose par le muscle squelettique, ceci serait tout à fait abusif. Cette interrogation mériterait néanmoins de se donner les moyens dans un premier temps, de mesurer les contenus en glycogène musculaire et hépatique, avant de recourir à des mesures de différence artério-veineuse musculaire et hépatique, difficilement réalisables chez l'animal et guère concevables chez l'homme.

### *C. Adaptations métaboliques liée à l'entraînement en endurance*

#### 1. Adaptations des capacités oxydatives globales et d'utilisation du pyruvate

Cette étude retrouve les adaptations quantitatives classiquement décrites à l'entraînement à la fois sur la performance aérobie mais aussi sur les adaptations mitochondriales quantitatives comme en témoignent l'augmentation des activités CS, 3-HAD, et du métabolisme de repos (Holloszy, et coll., 1970). L'élévation même si encore non significative des capacités oxydatives maximales mitochondriales montre néanmoins une nette tendance. Plutôt que discordant avec la littérature (Baldwin, et coll., 1972), ce résultat doit être interprété comme une augmentation des capacités oxydatives en cours avec une biogénèse mitochondriale encore partiellement fonctionnelle à 5 semaines, alors que les études préalables avaient pour la plupart été établies après 8 à 12 semaines d'entraînement.

Plus particulièrement, l'oxydation maximale en pyruvate est augmentée par l'entraînement de façon assez similaire aux capacités oxydatives globales (+20% sur la  $V_{max}$  pyr-glut-succ à l'entraînement en normoxie et +29 % pour la  $V_{max}$  pyruvate et 38% pour l'activité CS) laissant à penser que l'effet est essentiellement lié à l'augmentation de la densité mitochondriale. Une étude retrouvait d'ailleurs une augmentation de l'activité de la PDH, enzyme régulant le flux entrant de pyruvate dans la mitochondrie superposable à l'augmentation de l'activité CS ou cytochrome oxydase (LeBlanc, et coll., 2004).

***L'oxydation du pyruvate ne semble pas régulée de façon spécifique au cours des adaptations mitochondriales induites par l'entraînement.***

## 2. Adaptations des capacités oxydatives spécifiques des AG

### 2.1 Oxydation maximale des AGLC

De façon cohérente avec cette augmentation de la population mitochondriale suggérée ci-dessus, nous retrouvons une augmentation de l'activité 3-HAD, décrite comme enzyme terminale limitante de la  $\beta$ -oxydation.

Néanmoins, outre cet effet lié à la biogenèse mitochondriale, ubiquitaire sur l'ensemble des systèmes enzymatiques, une adaptation spécifique concernant le métabolisme des AG apparaît. En effet, il semble exister une adaptation relativement préférentielle sur les enzymes de la  $\beta$ -oxydation, comparativement aux enzymes du cycle de Krebs, comme le traduit ici l'élévation du rapport 3-HAD/CS avec l'entraînement. Ceci est en accord avec des données déjà bien établies qui montrent l'augmentation de l'oxydation des lipides au cours d'un exercice avec l'entraînement (Brooks and Mercier, 1994, Henriksson, 1977, Horowitz, et coll., 2000, Schrauwen, et coll., 2002, Tunstall, et coll., 2002). Plusieurs cibles moléculaires ont pu être identifiées comme participant à cette augmentation de l'oxydation des lipides comme notamment l'augmentation de l'expression des transporteurs membranaires des AG, Fat CD36 (Benton, et coll., 2006, Bonen, et coll., 1999), FABPpm (Talanian, et coll., 2010) ou encore d'autres enzymes de la  $\beta$ -oxydation MCAD et VLCAD (Horowitz, et coll., 2000), mais aussi la 3-HAD (Tunstall, et coll., 2002).

Cependant, malgré ces adaptations du transport sarcolemmal des AG et d'enzymes intramitochondriales favorables à l'oxydation de l'acylCoA, nous ne retrouvons ici aucune tendance à l'augmentation des  $V_{max}$  PC et PCoA. Notre équipe avait pourtant montré dans une expérimentation préalable une telle adaptation sur la  $V_{max}$  octanoate dans un muscle plantaris entraîné en endurance, certes pendant 8 semaines (poster ACSM data Lyse Barnéoud 2003). Ceci suggère que le transport des AGLC pourrait constituer une étape limitante de l'oxydation des AGLC lors des adaptations à l'entraînement. Cependant, cette absence d'adaptation spécifique au profit AGLC avait déjà été retrouvée dans une étude antérieure chez des athlètes soumis à un entraînement de haute intensité. Seule une amélioration notable concernant l'oxydation en substrats glucidiques avait été montrée, avec une adaptation plus importante de la fonctionnalité du complexe I que du complexe II (Daussin, et coll., 2008). Il est peu probable que nous soyons ici dans le même cas de figure compte tenu de l'intensité modérée des entraînements proposés et de la parfaite proportionnalité entre l'amélioration de

la fonctionnalité avec ou sans le complexe I de la chaîne respiratoire. Il nous semble donc plus vraisemblable d'envisager un frein sur le transport des AGLC, plutôt que sur le flux d'électrons issus du FADH<sub>2</sub> fourni par les AG. Cependant, ceci mériterait vérification par un protocole utilisant de l'octanoate, un AGCM.

*Alors qu'une adaptation intramitochondriale portant spécifiquement sur les enzymes de la  $\beta$ -oxydation comparativement aux enzymes du cycle de Krebs survient, on ne retrouve pas d'élévation conjointe des vitesses de respiration en PCoA ou même en PC. Ceci suggère l'existence d'un frein en amont de la  $\beta$ -oxydation à l'état entraîné.*

## 2.2 Transport mitochondrial des AG

De nombreuses études ont retrouvé une augmentation de la transcription (Tunstall, et coll., 2002) et de l'activité maximale CPT-1 mesurée sur muscle entier à l'issue d'un programme d'entraînement endurant (Berthon, et coll., 1998, Guzman and Castro, 1988, Koves, et coll., 2005, Mole, et coll., 1971, Talanian, et coll., 2010).

Ici, grâce à nos cinétiques en respiration mitochondriale *in situ* sur fibres perméabilisées spécifiques pour 2 types d'AGLC, le PCoA dont le transport est dépendant de CPT-1 et le PC dont le transport intramitochondrial est lui indépendant de CPT-1, nous avons pu détailler fonctionnellement les différentes étapes du transport intramitochondrial pour localiser les différents freins existant dans la situation d'entraînement.

✧ La première approche envisagée a consisté à exprimer les capacités oxydatives maximales de chaque type d'AGLC en rapport avec l'activité 3-HAD. Dans les deux cas, nous avons noté une altération des rapports V<sub>max</sub> PC et V<sub>max</sub> PCoA en fonction de l'activité 3-HAD. S'il semble bien exister une limitation spécifique du transport mitochondrial des AGLC comparativement aux capacités de  $\beta$ -oxydation, elle pourrait donc porter sur le transport CPT-1 en lui-même, mais aussi sur le transport en aval de CPT-1. En effet, comme l'intensité de la limitation des capacités oxydatives maximales en PC et PCoA comparativement aux adaptations de l'activité 3-HAD est du même ordre de grandeur pour ces 2 AGLC (approximativement 50%), il est difficile d'affirmer qu'il existe bien un frein sur CPT-1 indépendamment du frein en aval et ce, même si la littérature considère de façon établie que le

transport CPT-1 est une étape limitante du transport des AGLC. Par ailleurs, la limitation en aval de CPT-1 peut aussi bien concerner la fonction CPT-2, mais aussi l'activité de la carnitine acyl translocase.

✧ Nous avons ensuite complété cette approche du flux maximal par une étude du flux sous maximal pour ces AGLC. Aussi, outre cette limitation sur le flux maximal en PCoA, il existe également une diminution du flux sous-maximal en PCoA à l'entraînement retrouvé à la fois sur l'index CPT-1 et sur l'augmentation du Km pour le PCoA (données brutes non montrées). Cette observation surprenante semble à première vue incompatible avec les effets attendus de l'entraînement. Néanmoins, dans une étude préalable, Koves avait bien montré l'altération de la coopérativité négative entre le malonyl-CoA et CPT-1 avec l'entraînement (avec une altération du coefficient de Hill voisin de -1 chez les sédentaires à -0,5 dans les mitochondries intermyofibrillaires des rats entraînés) (Koves, et coll., 2005). Or, si les auteurs interprètent cette moindre coopérativité comme une diminution du pouvoir inhibiteur du malonyl-CoA, ceci pose aussi la question du compétiteur potentiel du malonyl-CoA. Dans une étude plus ancienne portant certes sur la forme hépatique de CPT-1 dont les régulations ont été mieux étudiées, il était clairement montré une évolution en miroir entre l'apparition d'une inhibition de type compétitif pour le malonyl CoA et la diminution de l'affinité pour le PCoA (Fraser, et coll., 2001). Aussi, il est probable qu'existe une relation étroite entre le pouvoir inhibiteur du malonyl-CoA et l'affinité de CPT-1 pour le PCoA. Cependant, n'ayant pas réalisé de courbe d'inhibition au malonyl-CoA dans notre étude nous ne pouvons discuter plus avant cette hypothèse. On pourrait toutefois objecter que notre cinétique au PCoA étant quoiqu'il en soit réalisée en l'absence d'ajout de malonyl-CoA, cette argumentation n'est pas licite. Cependant, même en l'absence d'ajout exogène de malonyl-CoA et même après rinçage soigneux des fibres, il est peu probable que toute trace de malonyl-CoA, régulateur physiologique de CPT-1 ait disparue. Aussi, l'augmentation du Km pour le PCoA à l'entraînement retrouvée ici et celle de l'IC50 pour le malonyl-CoA (Koves, et coll., 2005) sont cohérents si on envisage une inhibition compétitive entre ces deux molécules.

Il est cependant probable qu'une telle altération du flux sous maximal ne soit pas un frein en situation d'exercice compte tenu des taux circulants en AG au cours de l'exercice qui sont largement supérieurs aux concentrations sous maximales utilisées ici. Il n'en reste pas moins vrai que l'absence d'élévation des vitesses de respiration en AGLC conjointement à l'activité

HAD traduit bien une limitation sur le flux maximal des AGLC après 5 semaines d'entraînement.

✧ Enfin, l'étude du rapport  $V_{max}/K_m$  nous est apparue comme la meilleure façon de distinguer la part de l'altération indirecte du  $K_m$  consécutive à une augmentation de la masse mitochondriale, de la part liée à un véritable processus actif secondaire à une perturbation intrinsèque. En effet, toute augmentation de la masse mitochondriale peut s'accompagner d'une altération du  $K_m$  d'un système enzymatique uniquement secondaire à une moindre disponibilité de son substrat par unité de mitochondrie. Ceci relevant donc d'un processus non spécifique qui ne peut être discuté en soit comme adaptation qualitative. C'est d'ailleurs ce qui était retrouvé dans le cas particulier de la diminution de l'affinité pour l'ADP à l'entraînement (Zoll, et coll., 2002). Dans notre cas particulier de l'étude de la fonctionnalité CPT-1 les choses sont bien différentes puisqu'il n'existe pas d'augmentation moyenne de la  $V_{max}$  pour le PCoA, alors qu'on observe toujours une tendance à l'altération du rapport  $V_{max}/K_m$  à l'entraînement, certes non significative par rapport à l'altération du flux CPT-1, enregistrée à l'entraînement. Tout au plus, ceci indique qu'il peut exister une participation à l'altération de l'augmentation de la masse mitochondriale, mais que l'essentiel réside dans une véritable altération qualitative probablement en rapport avec un phénomène de compétitivité décrit ci-dessus. D'ailleurs, il existe une diminution des rapports de  $K_m$  PC/PCoA à l'entraînement qui témoigne d'une altération sélective du transport CPT-1 et non uniquement d'une dégradation consécutive à l'augmentation de la population mitochondriale dégradant l'affinité pour le PC et le PCoA dans les mêmes proportions.

✧ Concernant l'inhibition spécifique par le malonyl-CoA, nous pouvons seulement affirmer qu'il n'existe pas de variation de la fraction de CPT-1 résistance au malonyl-CoA, ce qui récuse l'évolution vers une l'isoforme hépatique de CPT-1. En effet, il est bien établi que l'isoforme musculaire est 100 fois plus sensible à l'inhibition par le malonyl-CoA que l'isoforme hépatique (Hue and Taegtmeyer, 2009).

Compte tenu de l'hypothèse déclinée ci-dessus, il nous paraît élégant d'envisager à l'avenir l'étude de la sensibilité au malonyl-CoA à une concentration faible et une concentration saturante de PCoA pour mieux rendre compte de l'évolution de cette sensibilité en fonction des concentrations en PCoA.

Cependant, si l'évolution des concentrations en malonyl-CoA au cours de l'exercice aigu a été assez bien étudiée, les conséquences de l'état d'entraînement sur les taux de malonyl-CoA musculaire au cours de l'exercice chez l'homme font encore débat. Certains notant une moindre diminution des concentrations en malonyl-CoA au cours d'un exercice réalisé à intensité absolue constante avant et après entraînement (Hutber, et coll., 1997), alors que plus récemment un plus faible taux de malonyl-CoA aurait été enregistré et mis en relation plutôt avec une augmentation de l'activité de MCD, qu'une modulation de l'activité de l'ACC et AMPK (Kuhl, et coll., 2006).

### 3. Autres adaptations mitochondriales spécifiques de l'entraînement

Même si notre étude n'était pas consacrée à la transition du phénotype métabolique glyco-oxydatif du muscle plantaris au cours de l'entraînement, nous avons pu aborder l'adaptation qualitative du système des créatine kinases mitochondriales par un protocole court en 3 points sans véritable cinétique à l'ADP. Ceci a permis de retrouver l'amélioration de l'efficacité du système des créatine kinases mitochondriales à l'entraînement comme déjà décrit précédemment par l'équipe (Zoll, et coll., 2002). Par contre et alors qu'il est décrit une fraction de CPT-1 résistante au malonyl-CoA plus importante dans un muscle rouge que dans un muscle blanc (Kim, et coll., 2002, Koves, et coll., 2005), nous n'avons pas retrouvé d'évolution de la proportion de la fonction CPT-1 inhibée par le malonyl-CoA. Cependant l'absence d'étude du profil MHC et de la composition du phénotype contractile des ces muscles dans ces études ne permettait pas de savoir si cette résistance au malonyl-CoA était reliée à un phénotype métabolique ou contractile. L'absence d'évolution de ce paramètre avec l'entraînement laisse à penser que cette caractéristique pourrait être plus en rapport avec le phénotype contractile que métabolique du muscle. En effet, l'entraînement modifie le phénotype métabolique, comme le montre entre autres l'adaptation du système des créatine kinases, alors que ses effets sur le phénotype contractile sont quasi inexistant.

#### ***D. Adaptations métaboliques liés à une exposition chronique à l'hypoxie***

Pour la première fois dans cette étude nous avons retrouvé une altération des capacités oxydatives globales après exposition passive à l'hypoxie. Ceci n'avait pas été le cas

antérieurement au cours des nombreux conditionnements effectués par notre équipe alors que le niveau d'exposition habituel était plus élevé (5500m versus 3200m; cf respectivement étude 1 et 3) et concernait des rats de sexe mâle, plus sensibles au stimulus hypoxique. Le conditionnement est par ailleurs plus long qu'habituellement (3 semaines versus 6 semaines). Plusieurs équipes avaient relevé une altération des capacités oxydatives globales après des expositions prolongées (Howald, et coll., 1990) à l'hypoxie. Cependant, lorsqu'une telle altération était retrouvée, il s'agissait la plupart du temps de sujets exposés à une très haute altitude, et soumis à une activité physique intense, associée à un déséquilibre majeur de la balance énergétique, comme cela est le cas au cours des expéditions Himalayennes. Dans notre situation, il s'agit comme nous l'avons noté, d'une altitude modérée (3200m), et qui ne s'accompagne pas d'un retentissement sur la croissance corporelle. Cependant, cette altération est essentiellement retrouvée sur l'activité CS et ne s'accompagne pas d'altération de la  $V_{max}$  mitochondriale. On observe, au contraire, une élévation du métabolisme basal pour laquelle nous évoquons l'existence d'un possible découplage mitochondrial après exposition à l'hypoxie, mais qui nécessiterait d'autres types de mesures (agents découplants) pour le confirmer. En effet, cette élévation de la  $V_0$  n'a pas été retrouvée dans une étude présentant le même type de conditionnement hypoxique mais utilisant des AG comme substrats et qui ne montrait d'ailleurs pas d'altération de l'activité CS (Galbes, et coll., 2008).

Cependant, alors qu'il existe une altération de l'activité CS chez les animaux hypoxiques, la voie enzymatique de la  $\beta$ -oxydation semble préservée, comme en témoigne l'augmentation du rapport 3-HAD/CS en hypoxie. Il s'agit d'un effet propre de l'hypoxie survenant indépendamment de l'effet de l'entraînement. Même s'il ne s'agit pas d'une véritable activation de la voie de la  $\beta$ -oxydation ce qui reste cohérent avec nos résultats de l'étude 1, cette sensibilité dissociée des enzymes du cycle du Krebs et de la  $\beta$ -oxydation à l'hypoxie n'avait jusqu'à présent jamais été montrée en ce sens. En effet, il avait plutôt été retrouvé une préservation des capacités oxydatives globales avec une atteinte sélective de l'activité HAD (Galbes, et coll., 2008, Kennedy, et coll., 2001) lors d'une exposition à l'hypoxie. Même si l'altitude simulée de ces 2 études est légèrement supérieure (respectivement 4300 m et 4000 m) à la nôtre, il est peu probable qu'une telle différence explique une telle discordance. Une autre différence doit par contre être prise en compte: il s'agit du sexe de l'animal. Dans les deux études citées, il s'agit de mâles, alors que nous avons utilisé des femelles, celles-ci préservant relativement bien le métabolisme des AG lors de l'exposition à l'hypoxie (Braun,

et coll., 2000, McClelland, et coll., 1999 ). Il faut cependant rappeler que dans l'étude 1 pourtant réalisée chez des males et à une altitude bien supérieure de 5500m, nous n'avons noté d'altération de l'activité 3-HAD dans aucun des muscles squelettiques étudiés.

Cette préservation sélective de l'activité 3-HAD est cohérente avec le maintien d'une oxydation maximale en PC lors de l'exposition à l'hypoxie. Néanmoins, il existe une diminution des capacités oxydatives maximales mesurées en PCoA après exposition à l'hypoxie. Comme cette altération concerne spécifiquement le PCoA et n'est pas retrouvée en PC, il est probable qu'existe un frein spécifique sur l'étape d'import des AGLC dans la mitochondrie dépendant de CPT-1. Même si nous n'avons pour l'instant aucune mesure biochimique de CPT-1, il a été montré une altération de la transcription (Huss, et coll., 2001) et de l'activité de CPT-1 dans un muscle glycolytique en hypoxie (Kennedy, et coll., 2001). Enfin ce frein fonctionnel avait déjà été suggéré sur mitochondries isolées par Galbès mais alors essentiellement attribué à une diminution de 30% de l'expression protéique de CPT-1 (Galbes, et coll., 2008). La limitation à l'utilisation du PCoA l'hypoxie est bien illustrée dans le tableau 8, où l'on constate l'impossibilité de maintenir une consommation d'oxygène habituellement fournie par les AG même pour des concentrations saturantes en ce substrat.

Outre ces altérations portant sur les capacités oxydatives maximales, il existe toutefois une véritable adaptation qualitative lors de l'exposition à l'hypoxie avec une amélioration de l'indice de flux pour le PC qui témoigne d'un effet facilitateur de l'hypoxie sur le transport du PC. Ceci est à rapprocher de l'évolution obtenue sur les Km au PC dans l'EDL et le SOL après 21 jours d'exposition à une altitude simulée de 5500m (étude1). Cette adaptation pourrait viser à compenser le frein existant en amont du PC sur l'entrée du PCoA. Alors que le flux maximal en PCoA à l'hypoxie est altéré, les adaptations qualitatives sur le transport du PC pourraient tout de même optimiser le cheminement des molécules d'AGLC vers la mitochondrie. Ainsi, l'amélioration comparativement plus importante de la sensibilité au PC que l'altération de celle au PCoA ( $K_{mPC}/K_{mPCoA}$  diminué en hypoxie) permet finalement de rétablir le flux sous-maximal en PCoA et qui n'a jusqu'à présent jamais été étudié en hypoxie.

---

*Si les capacités oxydatives globales semblent altérées par l'exposition à l'hypoxie, une préservation relative de la voie de la  $\beta$ -oxydation intramitochondriale semble observée. S'il fait peu de doute que l'hypoxie exerce un frein sur le transport CPT-1, il existe une facilitation sur les capacités de transport aval à CPT-1, limitant les altérations de l'hypoxie sur le transport sous maximal en PCoA, et rendant complexe une extrapolation sur les conséquences de l'hypoxie sur l'oxydation des AG in vivo.*

### ***E. Effet propre du traitement par agoniste PPAR- $\delta$***

#### **1. Agonistes PPAR- $\delta$ et fonction mitochondriale**

##### **1.1 Capacités oxydatives globales**

Dans notre étude nous ne retrouvons aucun effet du GW 742 sur les capacités oxydatives globales et les activités CS et 3-HAD, de même que les métabolismes basal et maximal ne sont pas modifiés par cette molécule. Le lien entre PPARs et biogenèse mitochondriale est encore débattu. Ainsi, des souris déficientes pour PPAR- $\delta$  muscle spécifique, présentent une altération profonde des capacités oxydatives (Schuler, et coll., 2006), alors qu'un agoniste sélectif PPAR- $\delta$  semble capable d'améliorer spécifiquement l'activité des complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire (Bastin, et coll., 2008). Aussi un panagoniste PPAR, le bezafibrate a-t-il été testé dans le traitement de certaines myopathies mitochondriales dans deux études distinctes (Bastin, et coll., 2008, Wenz, et coll., 2008). Si cet effet inducteur sur la biogénèse mitochondriale n'est pas retrouvé ici, nous ne montrons pas non plus d'altération profonde de la fonction mitochondriale, même s'il existe une tendance à une moindre activité CS et une altération minime de la respiration initiée en complexe II, systématiquement retrouvée dans tous les groupes traités. En effet, il a déjà été décrit, pour certains ligands pharmacologiques des PPARs, un effet péjoratif sur le fonctionnement du complexe I de la chaîne respiratoire (Scatena, et coll., 2004), en particulier pour certains agonistes PPAR- $\alpha$  de la famille des fibrates (sauf le bézafibrate) (Brunmair, et coll., 2004). Une étude récente menée *in vivo* a même montré un retentissement de ces altérations mitochondriales sur la fonction contractile cardiaque *in vivo* (Zungu, et coll., 2008). Ainsi, après 15 jours de traitement, les capacités oxydatives maximales en palmitoyl carnitine diminuent et une altération de la transcription d'un complexe de la chaîne respiratoire codé

par le génome mitochondrial, COX II apparaît. De plus, ces auteurs notaient également un métabolisme basal anormalement élevé ce qui pouvait évoquer un dommage membranaire responsable d'une fuite protonique (Zungu, et coll., 2009). Aucun de ces effets délétères n'est retrouvé ici pour le GW 742.

### 1.2 Capacités oxydatives spécifiques du type de substrats

S'il n'est pas retrouvé d'effet du GW 742 sur la biogénèse mitochondriale, notre étude suggère un effet sélectif sur l'oxydation des AG. Ceci est en accord avec une facilitation spécifique de l'oxydation des AG indépendamment d'un effet quantitatif mitochondriale et déjà suggéré dans une étude préalable (Kleiner, et coll., 2009). Même s'il n'est pas retrouvé d'augmentation de l'activité 3-HAD comme cela avait pu être montré précédemment (Constantin, et coll., 2007), il existe une augmentation des capacités oxydatives maximales pour les AGLC sous GW 742 et non retrouvée dans l'étude de Constantin. En effet, on note un effet propre du GW 742 sur l'oxydation maximale des AGLC plus marqué pour le PC que pour le PCoA (+ 25 % pour le PC contre seulement +16 % pour le PCoA). Si l'augmentation de l'oxydation des AG a déjà pu être montrée *in vivo* sur un organisme entier tant chez le rongeur (Jucker, et coll., 2007), que chez l'homme (Riserus, et coll., 2008), c'est à notre connaissance la première étude à montrer une augmentation de l'oxydation maximale en PCoA *ex vivo* sur fibres musculaires perméabilisées. De plus, il existe sous GW 742 une limitation de la vitesse absolue de la respiration en pyruvate, se traduisant par une diminution de la part relative fournie par le pyruvate à l'oxydation maximale.

Cet effet quantitatif sur l'oxydation des AGLC et la limitation relative de l'oxydation en pyruvate est à rapprocher des inductions transcriptionnelles décrites sous agoniste PPAR $\delta$ .

Parmi les gènes « cibles », on retrouve plusieurs gènes impliqués dans le transport mitochondrial des AGLC: CPT-1b (Dressel, et coll., 2003, Mascaro, et coll., 1998, Riserus, et coll., 2008) mais aussi CPT-2 (Barrero, et coll., 2003, Djouadi, et coll., 2005) et récemment la carnitine acyl-translocase (Gutgesell, et coll., 2009); mais aussi PDK-4, enzyme impliquée dans l'inactivation de la PDH, laquelle limite le flux entrant de pyruvate dans la mitochondrie (Constantin, et coll., 2007).

En plus de ces adaptations sous GW 742 concernant l'oxydation maximale des AGLC, sont ici suggérées des adaptations qualitatives. Ainsi, l'amélioration du rapport  $V_{max}/K_m$  pour le PCoA évoque une facilitation du transport CPT-1 sous GW 742. Outre l'aspect quantitatif, il

existe donc un véritable processus actif sur la sensibilité au PCoA permettant de conserver une Km bas alors même que la Vmax PCoA augmente. Même si notre étude ne prétend pas rechercher les bases moléculaires à cette adaptation qualitative, l'absence de modulation de l'inhibition par une concentration saturante en malonyl-CoA rend peu probable un glissement vers la forme hépatique de CPT-1 qui est nettement moins sensible (100 fois moins) au malonyl-CoA que la forme musculaire. D'autre part, ceci confirme, tout comme l'étude de la réponse à la créatine (cf : ci-dessous), l'absence d'effet notable du GW 742 sur le phénotype métabolique musculaire. En effet, il a été montré qu'un muscle glycolytique présentait une part de CPT-1 inhibable par le malonyl-CoA beaucoup plus importante qu'un muscle oxydatif (Kim, et coll., 2002) ;

D'autre part, il a récemment été montré qu'un agoniste PPAR $\gamma$ , le rosiglitazone était également capable d'induire une augmentation du contenu mitochondriale tant soussarcolemmal qu'intermyofibrillaire en Fat CD36 et ce alors que la quantité de protéines par fibre musculaire restait constante (Benton, et coll., 2008). Cette redistribution du pool cytosolique vers la membrane mitochondriale n'a pour l'instant pas été étudiée avec un agoniste sélectif de PPAR- $\delta$  mais son rôle dans la facilitation du transport du PCoA a été expliquée en introduction. Bien que nous n'ayons pu l'étudier isolément ici, la translocation de Fat CD36 est certainement préservée avec notre technique sur fibre perméabilisée, et pourrait participer à l'augmentation de la Vmax PCoA et faciliter le flux PCoA.

### 1.3 Autres effets mitochondriaux

Par ailleurs, notre étude ne montre pas de modification de la réponse à la créatine dans un muscle plantaris, ni à l'état sédentaire ni même à l'état entraîné. Or, le phénotype métabolique oxydatif d'un muscle squelettique est en partie caractérisé par une réponse marquée à la créatine, créatine qui diminue de façon drastique le Km à l'ADP (Kuznetsov, et coll., 1996). Le rôle de PPAR- $\delta$  sur l'évolution du profil métabolique n'a pu être retrouvé ici, alors que le profil glyco-oxydatif du muscle plantaris, recruté à la course en fait une cible de choix pour l'étude de ces modifications métaboliques au cours de l'entraînement. Il est vrai que la plupart des études s'intéressant au rôle de PPAR- $\delta$  dans le phénotype métabolique utilisait des modèles de surexpression par modification géniques (Wang, et coll., 2004) ou par transfection (Lunde, et coll., 2007) d'une forme constitutionnellement active du facteur de transcription. Or le GW 742, s'il correspond bien littéralement à la définition d'activateur PPAR- $\delta$ , ne

permet ni d'augmenter directement la quantité de ce facteur de transcription, ni de recruter d'autres cofacteur tels PGC-1 $\alpha$ , pourtant indispensables à son activité transcriptionnelle. Cependant, si à l'état sédentaire, il n'existe pas d'activation de PGC-1 $\alpha$ , la situation d'entraînement induit indubitablement la transcription de PGC-1 $\alpha$  dans un muscle recruté à la course. Cette étude est la première à aborder l'évolution du profil métabolique fonctionnel d'un muscle squelettique lors d'un entraînement associé à un traitement par activateur PPAR- $\delta$ . Cette première approche ne peut être considérée comme exhaustive, puisque nous n'avons pas pu réaliser de véritable cinétique à l'ADP, mais seulement un protocole à deux concentrations d'ADP avant et après ajout de créatine. Ceci méritera donc d'être complété par un protocole dédié, visant à étudier l'évolution du phénotype contractile du plantaris et l'étude d'autres muscles notamment de muscles entièrement glycolytiques, plus sensibles aux activateurs PPAR- $\delta$  que des muscles oxydatifs (Luquet, et coll., 2003, Wang, et coll., 2004). Récemment, une étude plus ciblée sur la tissu spécificité de la réponse au GW 501516 retrouvait une augmentation des activités CS et 3-HAD spécifiquement dans du gastrocnémien superficiel, aucune différence n'était vue dans le soléaire ou le gastrocnémien profond (Cresser, et coll., 2010). Quand à l'étude de Narkar, où avait été observée une évolution du phénotype contractile, avec une augmentation de la proportion en MHC de type I sous l'effet de l'entraînement et d'un traitement par GW 501516, ceci dans le muscle gastrocnémien de souris, au profil nettement plus rapide qu'un plantaris de rat (Narkar, et coll., 2008). Le muscle plantaris étudié ici, étant un muscle mixte glyco-oxydatif, il est possible que les effets du GW 742 ne soient pas suffisants pour être mesurés, surtout avec un protocole court.

## 2. Effets métaboliques extramitochondriaux du GW 742 sur le muscle squelettique

### 2.1 Augmentation du nombre de peroxisomes

Si l'oxydation des AG est essentiellement mitochondriale, les peroxisomes sont aussi capables de participer de manière complémentaire à la  $\beta$ -oxydation. Or, de fortes doses de GW 742 augmentent de façon importante le contenu en peroxisomes, tant au niveau des hépatocytes, que dans le muscle squelettique (Faiola, et coll., 2007).

## 2.2 Transport sarcolemmal des AG

Outre le transport mitochondrial détaillé dans cette étude, il est évident que le transport sarcolemmal qui s'effectue ici par simple diffusion dans des fibres perméabilisées nécessite *in vivo* des transporteurs membranaires des AG à la mesure des capacités de transport et d'oxydation en aval. Compte tenu de l'effet des agonistes PPAR- $\delta$  sur l'expression transcriptionnelle des transporteurs membranaires Fat CD36 (Tanaka, et coll., 2003) et FABP3 (Dressel, et coll., 2003, Kramer, et coll., 2007) FABPpm (Benton, et coll., 2006), mais aussi sur la translocation du pool cytosolique de ces transporteurs à la membrane sarcolemmale (Kalinowska, et coll., 2009), un facteur limitant en amont de la mitochondrie est peu probable.

### ***F. Coopérativité métabolique dans nos situations***

#### 1. Entraînement et agoniste PPAR

Si la proportion d'oxydation en pyruvate tend à diminuer discrètement chez les animaux sédentaires et traités au GW 742, la différence s'accroît avec l'entraînement tant sur les valeurs absolues de l'oxydation maximale en pyruvate que sur les valeurs relatives (respectivement  $-17\%$ ,  $P < 0,01$  et  $-15\%$ ,  $P < 0,005$  comparativement aux animaux entraînés non traités). Ceci peut-être expliqué par une potentialisation des effets propres de l'entraînement (LeBlanc, et coll., 2004, Stellingwerff, et coll., 2003, Watt, et coll., 2004) et d'un agoniste sélectif PPAR- $\delta$  (Constantin, et coll., 2007, Degenhardt, et coll., 2007, Kramer, et coll., 2007) sur l'activation de la PDK pouvant aboutir à un véritable frein sur l'activité PDH, limitant ainsi le flux entrant de pyruvate.

De façon parallèle, si l'effet du GW 742 sur les capacités oxydatives maximales en PC existe même chez les sédentaires, il n'est retrouvé de façon sensible pour le PCoA que chez les animaux entraînés (en normoxie,  $+17\%$  chez les entraînés traités au GW 742 vs  $+8\%$  chez les sédentaires traités). Alors qu'en valeur absolue les capacités oxydatives maximales spécifiques pour les AGLC sont augmentées par le traitement au GW 742, seule l'association à l'entraînement permet d'augmenter également la part relative représentée par l'oxydation des AGLC rapportée aux capacités oxydatives globales. De plus, cet effet n'est retrouvé que pour l'oxydation du PC et non pour l'oxydation du PCoA. Ceci tend à confirmer un effet du GW 742 plus marqué sur le transport en aval de CPT-1. Même si CPT-1 apparaît comme une

cible de PPAR (Mascaro, et coll., 1998) et plus particulièrement de PPAR- $\delta$  (Dressel, et coll., 2003), pouvant expliciter un effet quantitatif direct sur l'expression de cette protéine de transport, il existe un effet majeur sur CPT-2. Ainsi, CPT-2 a effectivement été établie comme cible spécifique de l'isoforme  $\delta$  des agonistes PPARs (Djouadi, et coll., 2005), dont l'action a été validée en clinique au travers l'usage thérapeutique d'un pan agoniste PPAR, indiqué dans la prise en charge des déficits sévères en CPT-2 (Bonfont, et coll., 2009). Ainsi, il existe une excellente corrélation entre l'induction transcriptionnelle CPT-2 et le gain d'activité enzymatique généré. En montrant la capacité d'un traitement agissant à la fois sur CPT-1 et sur CPT-2 à améliorer les capacités oxydatives en AGLC chez des patients porteurs d'un déficit congénital en CPT-2, le travail de cette équipe a contribué à redéfinir la notion de facteur limitant du transport des AG. En effet, CPT-1b a longtemps fait l'objet de toutes les attentions sous prétexte d'être la cible du malonyl-CoA, régulateur physiologique du transport des AGLC. Ceci a pu participer à la confusion qui a parfois été de considérer qu'une étape régulatrice était nécessairement une étape limitante.

Alors que l'entraînement seul augmente plus sensiblement la voie de la  $\beta$ -oxydation intramitochondriale que celle du transport du PC (effondrement du rapport  $V_{max}/3\text{-HAD}$ ), son association au traitement par GW 742 rétablit une proportionnalité entre  $\beta$ -oxydation et oxydation du PC, comme en témoigne la normalisation du rapport  $V_{max} \text{ PC}/3\text{-HAD}$  dans le groupe entraîné traité. Ceci suggère que le GW 742 pourrait rendre non limitante l'étape du transport des AGLC en aval de CPT-1. Ceci doit être nuancé par le constat que le GW 742 ne rétablit pas ce rapport si l'on considère l'oxydation en PCoA, qui reste donc sous dimensionnée comparativement aux potentialités offertes par la  $\beta$ -oxydation. La correction de ce rapport pour le PC, mais non pour le PCoA, outre qu'il confirme un rôle prépondérant sur CPT-2, permet également de répondre à la question posée précédemment concernant les facteurs limitant l'oxydation des AG après entraînement et d'affirmer qu'il existe bien deux freins distincts l'un sur CPT-1 et l'autre en aval.

Néanmoins, même si l'adaptation de la capacité maximale du transport CPT-1 est moindre que celle du transport en aval, le GW 742 pourrait avoir un effet qualitatif sur le transport CPT-1 lorsqu'il est associé à l'entraînement. Ainsi le GW 742 est en mesure de normaliser le flux sous maximal en PCoA largement altéré par l'entraînement. L'étude de l'efficacité catalytique permet de confirmer le rôle facilitateur du GW 742 sur le flux dépendant de CPT-1 ou tout au moins sa capacité à corriger les altérations induites par l'entraînement. En effet,

même si le GW 742 améliore globalement l'efficacité catalytique du système enzymatique CPT-1, cet effet est particulièrement sensible chez les animaux entraînés avec une amélioration de 120% pour seulement 25% chez les sédentaires. Ceci pourrait donc être en mesure de normaliser au moins le flux sous-maximal en PCoA dont on a dit précédemment qu'il était altéré à l'entraînement.

*En somme, cette situation d'entraînement associée au GW 742, met en évidence l'existence d'un frein à l'oxydation du pyruvate et d'une facilitation pour l'oxydation du PC, pouvant soutenir une orientation préférentielle vers l'oxydation de substrats lipidiques aux dépens des substrats glucidiques. Néanmoins, même si le GW 742 est en mesure de normaliser le flux sousmaximal en PCoA à l'état entraîné, l'augmentation de la Vmax PCoA restant moindre que l'augmentation de l'activité 3-HAD, il est probable que le transport CPT-1 reste une étape limitante de l'oxydation des AGLC, après mise en place des adaptations mitochondriales quantitatives à l'entraînement. Par contre, le transport en aval de CPT-1 (concernant la fonctionnalité de la carnitine acyltranslocase et/ou la fonctionnalité CPT-2) ne semble plus être un facteur limitant à l'entraînement lorsque l'on y associe une administration de GW 742.*

## 2. Entraînement et hypoxie

L'exposition à l'hypoxie limite les effets de l'entraînement sur l'augmentation des capacités oxydatives à la fois sur l'augmentation de l'activité CS (+36% chez les entraînés normoxiques, au lieu de +23% chez les entraînés hypoxiques), du métabolisme basal et maximal (+25% et +13%, respectivement, chez les entraînés normoxiques, ceux-ci restant inchangés sous l'effet de l'entraînement conduit en hypoxie). Si l'altération de la CS en hypoxie n'a pas de retentissement sur les capacités oxydatives mitochondriales au repos, on peut avancer qu'il existe probablement une biogénèse moins active lorsque l'entraînement est associé à une exposition à l'hypoxie. Ceci s'appuie sur des données de la littérature qui restent encore très discutées *in vivo* mais témoigne d'un effet supprimeur de l'hypoxie dans le processus de biogénèse mitochondriale *in vitro* (Zhang, et coll., 2007). Le frein à l'augmentation des capacités oxydatives représenté par le stimulus hypoxique est aussi

suggéré *in vivo* par le phénotype des souris déficitaires pour HIF-1 $\alpha$  muscle spécifique et qui présentent une augmentation considérable de leurs capacités oxydatives, mimant un état d'entraînement (Mason, et coll., 2007). Cependant, cette altération de la biogénèse à l'entraînement lors de l'exposition à l'hypoxie n'est pas constamment retrouvée et ne peut être considérée comme un dogme. Ainsi, plusieurs études menées par le passé ont montré une réponse identique de l'activité CS à l'entraînement quelque soit l'environnement (Bigard, et coll., 1991, Desplanches, et coll., 1993, Galbes, et coll., 2008). Il est d'ailleurs légitime de se demander quel est l'impact réel, au niveau de la PO<sub>2</sub> tissulaire d'un muscle, d'ajouter une hypoxémie systémique à l'hypoxie tissulaire d'exercice. Ainsi, on a pu évaluer la PO<sub>2</sub> tissulaire à 34mmHg dans un muscle repos, 23mmHg lors d'une exposition passive à 10% d'oxygène contre seulement 2 à 5mmHg dans un muscle à l'exercice en normoxie (Richardson, et coll., 2006, Richardson, et coll., 1995).

Nous ne rediscuterons pas ici les dernières revues de question sur les avantages du « training high-living low », qui évoquent un bénéfice plus grand de cette modalité d'entraînement sur le gain de mitochondries en particulier SS en réponse à l'entraînement (Flueck, 2009, Schmutz, et coll., 2010, Vogt, et coll., 2001). Cependant, même dans cette situation d'exposition intermittente à l'hypoxie, il n'existe pas de résultats constants (Bakkman, et coll., 2007) et la transposition à notre situation d'exposition chronique et continue à l'hypoxie ne semble pas licite. Encore une fois notre situation n'est ni celle d'un exercice aigu en hypoxie, ni celle d'une situation de « training high-living low », puisqu'on y observe des adaptations induites par une exposition passive chronique à l'hypoxie, tant classiques comme les adaptations hématologiques que plus nouvelles telle les adaptations métaboliques décrites dans les études 1, 2 et 3. Or, celles-ci sont peut-être aussi importantes que l'application de l'hypoxie pendant la seule durée de l'exercice.

Outre ces adaptations quantitatives non spécifiques, il existe une dissociation des effets de l'entraînement en hypoxie sur les capacités oxydatives en pyruvate et en PC. Ainsi, alors qu'au cours d'un entraînement en hypoxie les capacités oxydatives en pyruvate suivent la même altération que celle des capacités oxydatives globales ( $V_{max}$  pyruvate -30%  $P < 0,001$  comparativement au groupe entraîné en normoxie), les capacités oxydatives en PC sont conservées. Dans notre étude, malgré un protocole d'entraînement dont l'intensité a été adaptée à l'environnement, la capacité oxydative maximale mesurée en PCoA qui est diminuée par l'exposition isolée à l'hypoxie, n'est pas corrigée par l'entraînement alors que

dans l'étude de Galbès, l'entraînement rétablissait le niveau d'oxydation en PCoA à celui observé chez des animaux normoxiques (Galbes, et coll., 2008). Leur résultat est pour le moins surprenant quand on le confronte à la quantité de protéine CPT-1 et à l'activité HAD qui restent toutes deux effondrées dans le groupe entraîné en hypoxie et non améliorées par rapport aux valeurs mesurées dans le groupe exposé passivement à l'hypoxie. Même si une adaptation qualitative est toujours envisageable, son retentissement sur une capacité oxydative maximale reste hypothétique. De plus, ceci traduirait une augmentation de l'efficacité catalytique extrêmement importante, alors que dans notre étude ce groupe présente pourtant la plus basse valeur mesurée de tous les groupes ( $V_{max}/K_m$  PCoA à 0,017 contre 0,05 dans le groupe contrôle).

Néanmoins, le rapport HAD/CS augmentant en hypoxie et à l'entraînement indépendamment l'un de l'autre, aboutit à une potentialisation de ces 2 facteurs avec une adaptation plus marquée de la voie de la  $\beta$ -oxydation, comparativement aux adaptations du cycle de Krebs dans le groupes entraîné en hypoxie. De plus, l'effet de l'entraînement qui augmente la respiration résiduelle en complexe II, est uniquement retrouvé en situation d'hypoxie. Cette potentialisation des effets de l'entraînement et de l'hypoxie peut participer à l'amélioration de l'efficacité pour l'oxydation des AG à l'origine d'une production de  $FADH_2$ , équivalents réduits qui seront mieux utilisés dans la chaîne respiratoire de part l'efficacité accrue du complexe II de la chaîne respiratoire.

Par contre, alors que le flux en  $FADH_2$  pourrait être favorisé par l'association de l'entraînement et de l'hypoxie, l'adaptation sur le système des créatine kinases induite par l'entraînement, et tendant à améliorer les transferts d'énergie dans la fibre musculaire, semble limitée par l'exposition conjointe à l'hypoxie. Ceci est en contradiction avec une étude menée chez des athlètes soumis à des séances d'entraînement en hypoxie à haute intensité et chez lesquels une amélioration de l'index de la créatine kinase a été enregistrée (Ponsot, et coll., 2006). Cependant, cette étude a considéré des athlètes, soumis à de hautes intensités d'exercice pratiqué de façon intermittente en hypoxie, ce qui est bien différent des intensités d'exercice modéré appliquées à une population à la base sédentaire que l'on expose de façon permanente et continue à l'hypoxie.

*Malgré les effets facilitateurs de l'hypoxie sur le flux en PC, la potentialisation des effets de l'entraînement et de l'hypoxie sur la voie de la  $\beta$ -oxydation intramitochondriale et du devenir du  $FADH_2$  dans la chaîne respiratoire, il persiste un frein sur la capacité maximale de transport des AGLC dépendant de CPT-1. Cette étape semble rester une étape limitante pour la capacité à générer de l'énergie à partir du PCoA, puisque que la quantité d'énergie potentiellement fournie par les AG nécessiterait une concentration en PCoA dépassant les concentrations saturantes pour ce substrat (cf: tableau 3).*

### 3. Hypoxie-agoniste PPAR- $\delta$

Il est tout d'abord remarquable que sur l'ensemble des variables étudiées, il n'existe aucune interaction entre ces 2 facteurs. Même si l'hypoxie et le GW 742, agissent isolément sur la respiration en PC, augmentant pour le premier le flux sous-maximal en PC, pour le second la vitesse maximale de respiration en PC, il n'existe pas de potentialisation de ces deux facteurs. Concernant, le transport dépendant de CPT-1, le GW 742 ne limite pas la baisse de l'oxydation maximale en PCoA induite par l'hypoxie. Tout au plus, l'augmentation d'efficacité catalytique due au GW 742 permet d'atténuer l'effet délétère de l'hypoxie sur ce paramètre.

*L'absence de coopérativité entre ces deux situations est probablement liée à l'absence d'activation suffisante du facteur de transcription PPAR- $\delta$  à l'état sédentaire alors qu'après 6 semaines d'hypoxie il n'existe plus d'élévation des AGL, ligands naturels, qui auraient pu jouer le rôle d'activateurs.*

### 4. Entraînement-hypoxie-agoniste PPARs

L'amélioration spectaculaire de la performance aérobie observée dans le groupe entraîné en hypoxie et traité ne peut absolument pas être expliquée par des adaptations quantitatives mitochondriales quand on observe simplement que l'augmentation de la CS est de 39% chez les animaux entraînés en normoxie non traités et de 19% seulement, dans le groupe entraînés en hypoxie et traités. Il existe pourtant une véritable coopérativité entre, d'une part l'entraînement, et d'autre part l'exposition à l'hypoxie, en particulier associée au traitement par un agoniste PPAR- $\delta$ , et participant à l'amélioration du temps limite. Nous allons nous

attacher maintenant à isoler les particularités retrouvées uniquement dans ce groupe, en nous efforçant de mettre en lumière de possibles aspects métaboliques participant à l'amélioration de cette performance en endurance.

L'effet facilitateur de l'hypoxie sur le flux sous maximal en PC est démultiplié dans le groupe entraîné et traité, sans que nous puissions donner d'explication claire à cette observation, étant donné qu'il n'existe ni d'effet propre de l'entraînement, ni du GW 742 sur ce critère.

Concernant le transport CPT-1, même si le flux sous maximal en P<sub>CoA</sub> et l'efficacité catalytique du système CPT-1 ne sont pas revenus aux valeurs contrôles, le GW 742 permet d'améliorer l'efficacité catalytique CPT-1 par rapport aux altérations enregistrées quand on associe l'hypoxie et l'entraînement, deux facteurs indépendamment péjoratifs pour le transport CPT-1.

Compte tenu de la facilitation sur le flux CPT-2 dans ce groupe qui est plus que doublé par rapport au groupe entraîné en normoxie et traité, on peut émettre l'hypothèse d'une facilitation CPT-2 qui pourrait compenser l'altération persistante du flux sous maximal en P<sub>CoA</sub> dans ce groupe. De plus, à l'exercice, compte tenu des taux d'AGL circulants, il est possible que cette altération persistante sur le flux sous maximal en P<sub>CoA</sub> ne reflète pas nécessairement un retentissement fonctionnel, et ne soit en fait pas limitante.

Surtout, la normalisation de la V<sub>max</sub> P<sub>CoA</sub> n'est retrouvée que dans le groupe HET, alors que dans les autres groupes l'effet délétère de l'hypoxie sur les capacités maximales d'oxydation du P<sub>CoA</sub> persiste. Ainsi la V<sub>max</sub> P<sub>CoA</sub> est augmentée de 40% dans le groupe traité, en comparaison du groupe entraîné en hypoxie non traité.

Aussi, CPT-1 ne semble plus constituer un frein à l'oxydation maximale du P<sub>CoA</sub> ; ce qui est bien illustré dans le tableau 3 où dans ce groupe, l'oxydation du P<sub>CoA</sub> permet d'atteindre la fourniture d'énergie théorique possible à partir des AG pour une concentration sous maximale, alors que dans toutes les autres situations d'entraînement ou d'exposition à l'hypoxie, la concentration en P<sub>CoA</sub> nécessaire dépasse déjà la concentration saturante.

***L'extrême facilitation du transport du PC ainsi que la levée du frein sur les capacités oxydatives maximales en P<sub>CoA</sub> observées dans ce groupe pourraient participer à l'amélioration de la performance en endurance en facilitant l'utilisation des AGL.***

*Deux questions restent néanmoins posées :*

*- quels sont les bénéfices réels attendus sur un organisme au repos compte tenu des altérations de la fonctionnalité sous-maximal CPT-1 observées ?*

*- bien que les capacités oxydatives maximales en PCoA soient maintenues chez les animaux entraînés traités en hypoxie, il persiste une altération relative du rapport  $V_{max}$  PCoA/activité 3-HAD par rapport au niveau contrôle. Dans ces conditions, le transport CPT-1 reste-t-il limitant au regard du potentiel oxydatif global et spécifique de la  $\beta$ -oxydation de ce groupe ?*

***G. Que retenir de nos résultats sur le métabolisme énergétique dans ces diverses situations***

Si, concernant la capacité maximale aérobie, évaluée ici indirectement par la VMA, le déterminant majeur semble être la quantité de mitochondries par unité de tissu, l'endurance à puissance sous-maximale, évaluée par le temps de maintien à 65% de la VMA n'est que très partiellement expliquée par ces données quantitatives. Si l'augmentation du temps limite chez les animaux entraînés peut en partie être attribuée à l'adaptation préférentielle et plus marquée sur la voie de la  $\beta$ -oxydation, une des limites pourrait en être chez des organismes entraînés le transport des AGLC. Ainsi, et alors que pour un organisme sédentaire l'équipement enzymatique mitochondriale est certainement le facteur limitant, sur un organisme entraîné, le frein pourrait se situer en amont de la mitochondrie. Ainsi, nous pouvons suggérer ici qu'existe, à l'état entraîné, un frein à deux niveaux, l'un sur le transport CPT-1 et l'autre sur le transport en aval de CPT-1 portant ou sur la CAT et/ou sur CPT-2.

Quant à l'environnement hypoxique, il semble par lui-même en mesure de faciliter le transport du PC et le flux de  $FADH_2$  mais avec un frein en amont sur le transport CPT-1.

Le traitement par GW 742 pourrait, quant à lui, agir aux deux niveaux, d'une part en améliorant l'efficacité catalytique de CPT-1 et en améliorant les capacités maximales d'oxydation du PC d'autre part.

On peut ainsi proposer une explication à l'amélioration du temps limite en situation d'entraînement en hypoxie sous GW 742. La facilitation du transport CPT-1 liée au GW 742 pourrait compenser en partie le frein induit par l'hypoxie à ce niveau. Par ailleurs, la

facilitation des étapes en aval de CPT-1 (transport CAT- CPT-2 et complexe II) spécifiques de l'adaptation à l'hypoxie pourrait optimiser l'oxydation de chaque molécule de PC formée dans l'espace intermembranaire. Ceci ne signifie pas pour autant que le transport CPT-1 ne serait plus limitant, mais simplement que la facilitation du transport en aval de CPT-1 par l'hypoxie, associée à l'augmentation du flux maximal en PC sous GW 742, pourrait compenser les conséquences fonctionnelles du frein CPT-1 sur l'oxydation des AGLC.

Outre ces adaptations métaboliques mitochondriales largement détaillées ci-dessus, d'autres facteurs influençant la performance aérobie sont susceptibles d'être modulés dans nos groupes expérimentaux hypoxiques et traités, susceptibles de participer à la potentialisation des effets d'un entraînement endurant.

#### ***H. Autres facteurs expliquant l'amélioration de la performance en endurance***

L'amélioration de la performance en endurance chez les animaux entraînés en hypoxie et traités au GW 742 peut être expliquée par des facteurs n'ayant pas une origine métabolique.

##### **1. Le poids corporel**

Toute performance en endurance doit être rapportée au poids corporel des sujets, car le rapport poids-puissance est toujours avantageux pour des sujets de faible poids corporel. Ainsi, dans l'étude d'Abdelmalki, l'amélioration du temps limite avant épuisement, constatée après la réalisation d'un entraînement chez animaux stabulés en hypoxie, était essentiellement liée à l'abaissement du poids corporel dans ce groupe, comme le prouvait l'amélioration similaire enregistrée dans le groupe normoxique entraîné, apparié en prise alimentaire (Abdelmalki, et coll., 1996).

Si dans cette étude, la perte de poids corporel des animaux exposés en hypoxie semblait être le principal facteur responsable de l'amélioration de la performance en endurance dans le groupe hypoxique, ceci ne peut être le cas dans notre étude, les animaux hypoxiques présentant un poids en fin de conditionnement comparable aux animaux normoxiques.

Cependant, si l'argument du poids corporel ne peut participer à expliquer l'amélioration de la performance en hypoxie, il pourrait contribuer pour partie à l'amélioration de temps limite

chez les animaux traités au GW 742, qui présentent un poids corporel en fin de conditionnement un peu inférieur. Cet effet global du GW 742 sur le poids des animaux traités n'est néanmoins pas en mesure d'expliquer l'amélioration spécifiquement notée dans le groupe entraîné en hypoxie et traité.

## 2. Les facteurs cardio-pulmonaires et circulatoires

### 2.1 Les échanges alvéolo-capillaires

L'étude de la baisse des performances aérobies maximales à l'hypoxie, et en particulier l'altération de la consommation maximale d'oxygène avec la montée en altitude, a été reliée le plus souvent à une baisse des capacités de transport de l'oxygène vers les tissus. Cependant, le constat d'une altération relative plus grande chez les sujets préalablement entraînés a pu être reliée à une limitation au niveau de la diffusion alvéolocapillaire (Bourdillon, et coll., 2009). Or, il a récemment été montré que le GW 742 pourrait limiter l'HTAP hypoxique et limiter l'hypertrophie ventriculaire droite secondaire (Crossno, et coll., 2007, Harrington, et coll., 2010). Même si cet effet du GW 742 semble indépendant de l'activation PPAR- $\delta$ , et plutôt médiée par une inhibition des Rho kinase, la conséquence pourrait aboutir à l'allongement du temps de diffusion alvéolocapillaire et donc à une meilleure resaturation du sang pulmonaire veineux. Néanmoins, ce bénéfice théorique doit être mis en balance avec la détérioration du rapport ventilation-perfusion lorsque l'HTAP hypoxique est levée.

### 2.2 Le travail cardiaque ?

Si la fonction cardiaque est à priori plutôt bien conservée lors d'une exposition chronique à l'hypoxie de durée moyenne, (Zungu, et coll., 2007) surtout pour un niveau d'hypoxie relativement modéré, comme c'est le cas dans notre étude, cela n'exclut pas que le travail cardiaque puisse être un facteur limitant lors de l'exercice en hypoxie. Néanmoins, ceci semble peu plausible dans notre situation où l'amélioration de la performance sous l'effet du traitement par GW 742 porte exclusivement sur la performance sous maximale et pas du tout sur la vitesse maximale aérobie.

### 2.3 Les facteurs vasculaires

Un paramètre qui participe pour bonne part à la performance aérobie réside dans la vascularisation du muscle à l'exercice. En effet, la capacité aérobie de longue durée est issue d'un compromis permanent entre l'oxygène et les substrats apportés par le sang, la capacité du muscle à capter ces ressources, puis à les utiliser par oxydation phosphorylante. En ce sens, le réseau vasculaire est une variable qui doit permettre à chaque moment la meilleure adéquation possible entre le réseau mitochondrial et les apports plasmatiques. C'est tout l'enjeu de l'angiogénèse induite par l'entraînement endurant.

Depuis que l'on s'est intéressé à la réponse angiogénique au cours de l'exercice, la question de l'impact du stimulus hypoxique sur celle-ci a été posée (Biro, et coll., 2003, Richardson, et coll., 1999). Il y déjà plusieurs années, et avant que les outils moléculaires ne soient à notre disposition, l'augmentation spécifique de réseau capillaire lors d'un entraînement réalisé en hypoxie avait été suggérée comme facteur de compensation de la moindre réponse mitochondriale, permettant de maintenir une efficacité comparable à celle d'un entraînement conduit en normoxie (Desplanches, et coll., 1993). Une récente revue de la littérature (Vogt and Hoppeler, 2010) reprenant les effets bénéfiques de la stratégie de «training high-living low», suggère d'ailleurs une réponse angiogénique accrue. Ainsi une induction de VEGF, facteur de transcription impliqué dans l'angiogénèse et sensible à l'hypoxie car induit par Hif-1, semble plus marquée lors d'un entraînement en hypoxie comparativement à la réponse obtenue en normoxie (Vogt, et coll., 2001).

Outre le stimulus hypoxique, PGC-1 $\alpha$ , largement induit au cours d'un exercice endurant, participerait aussi à cette réponse angiogénique en régulant aussi l'expression du VEGF (Arany, et coll., 2008, Leick, et coll., 2008). L'équipe de Grimaldi a récemment montré que le GW 501516 était capable d'induire une réponse angiogénique précoce dans le muscle squelettique par une voie dépendante de la calcineurine (Gaudel, et coll., 2008). Aussi, l'association du stimulus hypoxique stabilisant Hif-1 d'une part, et l'activation de la voie calcineurine par l'exercice et l'hypoxie, ainsi que de l'agoniste PPAR- $\delta$  par l'entraînement, d'autre part, pourraient concourir à une réponse angiogénique particulièrement intense dans le groupe entraînés en hypoxie et traité et participer ainsi à l'amélioration de la performance observée. Enfin, il a récemment été montré que, parmi les différents membres de la famille VEGF, le VEGF-b était très exprimé par les muscles oxydatifs. Or, le VEGF-b exerce de façon paracrine un rôle dans la prolifération des cellules endothéliales, mais induit également

l'expression de protéines de transports des AG, les FATP permettant un efflux plus important à travers la membrane endothéliale et une diffusion à travers le sarcolemme (Hagberg, et coll., 2010). Cette découverte permet de relier de façon encore plus étroite angiogénèse et métabolisme énergétique en contrôlant conjointement la disponibilité en substrats et le transport membranaire actif.

### 3. Les facteurs centraux

Enfin, le retard à la survenue de la fatigue ne doit pas faire oublier les hypothèses d'une origine centrale de la fatigue.

Or, les effets des agonistes PPARs sur la prise alimentaire, c'est-à-dire la tendance à l'hypophagie sous agonistes PPAR $\alpha$  (Peters, et coll., 2003), accrue par l'association avec un agoniste  $\delta$  (Harrington, et coll., 2007), ou au contraire la polyphagie classiquement décrite sous glitazones, montrent que les agonistes PPARs ne sont pas exempts d'effet centraux. Il a d'ailleurs été récemment suggéré un effet neuroprotecteur du GW 501516 par limitation de l'inflammation neuronale (Defaux, et coll., 2009). Associé à la neuroprotection induite par le préconditionnement hypoxique et notamment l'induction d'EPO et de son récepteur central sur les cellules de soutien, ces effets pourraient participer à la résistance extrême des animaux entraînés en hypoxie et traités au GW 742 (2 animaux ont pu courir plus de 9 heures de course sur tapis).

#### ***I. Compléments de données envisagées***

Les études métaboliques fonctionnelles proposées ici *in situ* mériteraient d'être complétées par un dosage classique de l'activité CPT totale et de celle inhibable par le malonyl-CoA représentant la part spécifique de CPT-1.

Enfin, deux autres hypothèses mériteraient d'être explorées pour totalement détailler les étapes fonctionnelles impliquées dans l'oxydation des AGLC et leurs modulations dans ces situations. Ainsi, si notre étude permet d'exclure une modification de la part de CPT-1 inhibable par le malonyl-CoA, il reste à préciser l'évolution de la sensibilité au malonyl-CoA.

Par ailleurs, un autre acteur du transport mitochondrial a récemment été identifié, à travers la présence d'une fraction mitochondriale de Fat CD36, colocalisée avec CPT-1 (Campbell 2004, Bezaire 2006) et surtout pouvant être modulée indépendamment de l'activité CPT-1. Même si, comme nous l'avons dit en introduction, CPT-1 reste indispensable à l'oxydation des AGLC, la contraction musculaire *per se* (Campbell, et coll., 2004, Holloway, et coll., 2009), l'exercice (Holloway, et coll., 2006) ou l'entraînement (Schenk and Horowitz, 2006, Talanian, et coll., 2010) semblent capables de moduler cette signalisation. Si la translocation de Fat CD36 à la membrane mitochondriale ne semble jouer qu'un rôle mineur dans le métabolisme basal de l'oxydation des AG (King, et coll., 2007), son rôle dans les adaptations à l'entraînement pourrait être notable (Holloway, et coll., 2009). Il n'est à ce jour, et à notre connaissance, pas possible d'étudier la part du transport des AGLC impliquant cette voie par technique de respiration mitochondriale, le seul inhibiteur connu pour être spécifique de Fat CD36, le sulfo-N-succinimidyl oleate (SSO) présentant des effets inhibiteurs sur le fonctionnement global de la chaîne respiratoire (Holloway, et coll., 2009). Le recours à des souris KO CD36 pourra néanmoins être envisagé pour répondre à cette question.

Comme nous l'avons dit au cours de la discussion, il serait aussi intéressant de préciser le lien entre phénotype contractile et traitement par GW 742 dans ces situations, voire en considérant d'autres muscles.

Enfin, un volet consacré aux modulations de l'angiogénèse pourrait être réalisé afin d'étudier l'éventuelle potentialisation des effets angiogéniques de l'hypoxie, de l'exercice et du GW 742 détaillés ci-dessus.

**DISCUSSION GENERALE**

## **I. Critique de la technique de respiration mitochondriale dans l'étude de la préférence de substrat.**

### ***A. Avantages***

La réalisation de cinétiques pour différents substrats avec modélisation Michaélienne sur fibres perméabilisées permet à la fois i) d'enregistrer les variations quantitatives liées à la biogenèse mitochondriale ayant eu lieu dans les fibres musculaires, ii) et d'étudier les adaptations fonctionnelles qualitatives, intrinsèques aux mitochondries notamment à travers l'affinité des systèmes enzymatiques pour leur substrat.

Au regard de la littérature, on peut juger de la difficulté à étudier ces deux aspects conjointement, encore à l'heure actuelle. La mesure d'une activité enzymatique classique nécessite forcément de réaliser ces dosages sur les différents éléments cellulaires (muscle entier et fraction mitochondriale) avant de pouvoir approcher la part du quantitatif et du qualitatif. De plus, la plupart des activités enzymatiques réalisées en point final avec une concentration saturante de substrat ne peuvent rendre compte des adaptations sous-maximales, peut-être tout aussi importantes et dont la relevance physiologique pourrait s'avérer plus informative qu'une capacité maximale, en particulier en situation pathologique. Mais cet aspect plus conceptuel que technique sera discuté plus loin dans les intérêts thérapeutiques.

D'autre part, si à l'état contrôle, il semble exister peu de différences fonctionnelles entre les fractions sous-sarcolemmales (SS) et inter-myofibrillaires (IMF), leurs réponses adaptatives à une perturbation semblent être différentes. Ainsi, si l'augmentation de la capacité maximale à oxyder du palmitate en réponse à l'entraînement semble plus marquée dans la fraction SS, la plasticité de la fraction IMF concernant la sensibilité au malonyl-CoA est plus grande (Koves, et coll., 2005). Aussi, pour toute étude s'intéressant non pas à la caractérisation d'un système, mais à sa capacité d'adaptation, comme c'est le cas dans nos interrogations de physiologistes, il apparaît donc fondamental de conserver les deux fractions mitochondriales dans la proportion effectivement réalisée *in situ*.

Outre l'intérêt d'étudier la population mitochondriale dans son intégralité, la technique de respiration sur fibres perméabilisées permet aussi de préserver les interactions cellulaires. Or, nous avons pu voir combien la fonctionnalité CPT-1 était complexe. Une activité

enzymatique mesurée sur homogénat musculaire ne peut préserver les interrelations physiques entre membrane mitochondriale externe et interne. De plus, même si nous ne nous sommes pas intéressés à la sensibilité au malonyl-CoA, son exploration peut être envisagée dans les meilleures conditions avec notre technique. En effet, outre le rôle de l'environnement membranaire sur la sensibilité à l'inhibition par le malonyl-CoA (Fraser, et coll., 2001), l'état de phosphorylation de CPT-1 est essentiel (Kerner, et coll., 2004) et les techniques d'extraction sur tissu entier ou d'isolement mitochondrial extrêmement drastiques, ne permettent pas de préserver celui-ci.

Enfin, si les interrelations entre membranes mitochondriales sont importantes, les interactions membrane externe et cytoplasme le sont également, notamment dans l'étude de la fonctionnalité d'une enzyme aux multiples sites de fixations : acétyl-CoA, CoASH, carnitine, malonyl-CoA, palmitoyl-CoA (Starritt, et coll., 2000). Or, pour étudier la coopérativité négative ou positive (Koves, et coll., 2005) entre ces différents acteurs il faut garantir ces échanges entre membrane externe mitochondriale et cytoplasme. De plus, comme nous l'avons dit précédemment, les interactions des mitochondries-cytosquelettes sont nécessaires à une activité optimale de CPT-1 dans le foie.

### ***B. Quel sens donner à nos mesures in situ ?***

#### 1. Niveau d'utilisation d'un substrat

A proprement parler, la préférence de substrat s'entend *in vivo*, comme la plus ou moins grande propension d'un tissu à oxyder tel ou tel substrat, présents conjointement dans son environnement. Nous ne pouvons évidemment pas étudier en temps réel la part relative de la consommation d'oxygène liée à l'oxydation des glucides ou des lipides dans notre chambre de respiration. Ainsi, quand nous parlons de « niveau d'utilisation d'un substrat » en respiration *in situ*, le terme est abusif puisqu'il ne rend pas compte de l'utilisation relative d'un substrat par rapport à l'autre, mais de la potentialité maximale des mitochondries à utiliser ce substrat rapporté aux capacités oxydatives maximales du tissu, ce qui est bien différent.

#### 2. Affinité pour un substrat

L'affinité pour un substrat, qui est donc défini sur le plan biochimique comme l'inverse du  $K_m$  apparent pour le substrat d'un système enzymatique, permet d'approcher deux notions :

celle d'une utilisation sous-maximale, mais aussi celle de facilité relative à utiliser un substrat ou un autre. C'est cette dernière approche qui permet peut-être la meilleure transposition à la notion de « préférence de substrat » *in vivo*. Comme toute approche sous-maximale, elle ne peut qu'éventuellement rendre compte d'une utilisation préférentielle de substrat dans un état stable, situé à distance des capacités oxydatives maximales. La transposition d'affinité pour un substrat à une préférence de substrat doit toujours être mise en perspective avec les concentrations physiologiques en substrat dans le tissu.

Il semble par contre hasardeux d'extrapoler des résultats d'affinité à la situation d'exercice aigu, dans laquelle on travaille en situation maximale et où les concentrations de substrats circulantes sont extrêmement élevées.

### ***C. Limites et inconvénients***

Cependant la transposition de l'*in situ* à l'*in vivo* reste limitée du fait de facteurs qui ne sont pas pris en compte dans la chambre de respiration, mais qui ont leur importance dans la fibre musculaire.

#### 1. Régulation par le malonyl-CoA

En premier lieu, même si notre modèle de fibre perméabilisée conserve intacte la régulation par le malonyl-CoA, nos protocoles de respiration pour les AG sont fait en l'absence des modulations physiologiques des concentrations en malonyl-CoA.

#### 2. Interrelation avec les glucides

Ensuite nos cinétiques de substrats sont forcément faites en l'absence d'autre substrat compétiteur, ce qui ne peut rend compte des variations de flux intra-cytosoliques en différents substrats, et qui pourraient influencer l'orientation métabolique (cycle de Randle). Nous approchons ainsi seulement la potentialité intrinsèque des mitochondries à utiliser préférentiellement tel ou tel substrat, sans tenir compte des interactions compétitives entre substrats qui surviennent *in vivo*.

#### 3. Effet inhibiteur des AG sur la fonction mitochondriale

Enfin dans les études 1 et 3, nous avons pu constater que les AGLC exerçaient un effet limitant sur les capacités oxydatives maximales en pyruvate-glutamate-succinate, de 60% pour le PCoA et de 40% environ pour le PC. Cet effet a déjà été décrit et semble spécifique

des AGLC et essentiellement lié à une action sur l'ATP-synthase compte tenu des effets n'existant pas sur des mitochondries découplées (Ventura, et coll., 2005). Les quelques tests réalisés dans notre laboratoire (données non présentées) et qui n'ont pas retrouvé de limitation de la  $V_0$ , sont en accord avec cette hypothèse.

La grande interrogation reste de savoir si cet effet constaté *in situ* existe aussi *in vivo*. En effet les concentrations utilisées ici sont des concentrations physiologiques mesurées dans le milieu (Ray, et coll., 2002).

#### ***D. Améliorations envisagées dans le futur***

Bien que notre protocole ait fait l'objet de validations avant l'expérimentation, les évolutions des autres équipes nous amènent à rediscuter certains paramètres. Ainsi l'équipe de Spriet a modifié son protocole de mesure de l'activité CPT-1 en modifiant la quantité de carnitine de 0,4 mM à 5 mM (Berthon, et coll., 1998, Starritt, et coll., 2000). Dans notre protocole actuel, la quantité de carnitine à 1mM pourrait être relevée, d'autant qu'il a été montré que dans certains circonstances, une trop faible concentration en carnitine pouvait potentialiser l'inhibition de l'activité CPT-1 par le malonyl-CoA (Starritt, et coll., 2000).

Concernant l'inhibition de la respiration par les AGLC, nous pourrions envisager d'augmenter la quantité de BSA présente dans notre milieu de respiration. En effet dans l'étude de Ventura citée ci-dessus et dans nos travaux, les quantités de BSA sont respectivement de 0,1 et 0,2% alors que d'autres équipes travaillent à des concentrations bien supérieures, allant de 0,5% chez Spriet (Berthon, et coll., 1998, Starritt, et coll., 2000) à 1% chez Zammit (Fraser, et coll., 2001). Ces fortes concentrations de BSA sont susceptibles de limiter l'effet détergent des AGLC et méritent au moins d'être testées à l'avenir, même si nous n'avons observé aucun cas de lésions membranaires mitochondriales au cours de nos expérimentations et des nombreux tests au cytochrome C réalisés.

## II. Confrontation des trois temps expérimentaux.

### *A. Adaptation métabolique liée à l'hypoxie chronique*

#### 1. Effet dose de l'hypoxie

Grâce à ce travail, nous pouvons juger d'un effet dose du stimulus hypoxique par deux approches :

- d'une part, l'étude de deux types de muscles, l'un oxydatif, le SOL et l'autre glycolytique, l'EDL dont nous avons pu voir qu'ils étaient différemment sensibles au stimulus hypoxique.
- d'autre part, nous avons, pour des raisons techniques, fait varier les niveaux de l'hypoxie appliquée dans les études 1 et 3 respectivement 5500m et 3200m.

Comme montré dans l'étude 2, le muscle EDL semble nettement plus sensible au stimulus hypoxique et présente une réponse transcriptionnelle plus marquée que le SOL. D'autre part, l'étude 1 retrouvait une adaptation tant des capacités maximales d'oxydation en PC que de l'affinité pour ce substrat prépondérant dans l'EDL où la réponse hypoxique est clairement distincte de l'effet de la restriction calorique. Sans faire de lien de cause à effet abusif entre une observation à 6 et 24h et les adaptations métaboliques à 21 jours, ceci apporte du crédit à un effet propre de l'hypoxie.

Par ailleurs, alors que nous retrouvons un effet net d'une exposition à 5500m sur l'affinité pour le PC, cet effet existe mais de façon plus modérée à 3200m, où l'on observe une majoration du flux sous maximal en PC, sans cependant de diminution significative du Km.

Le fait que le sexe des rats diffère entre ces 2 études, mâles pour la première et femelles pour la dernière ne semble pas constituer un biais important compte tenu du fait que le métabolisme des femelles a toujours été montré plus favorable à l'oxydation des AG que celui des mâles (Braun, et coll., 2000, McClelland, et coll., 1999 ).

#### 2. Densité mitochondriale et hypoxie

Si, pour nous, l'exposition chronique passive à l'hypoxie est loin d'altérer systématiquement les capacités oxydatives globales, son rôle frénateur sur la biogenèse mitochondriale, lorsque celle-ci est stimulée par d'autres facteurs, apparaît plus probable.

## 2.1 Durée de l'hypoxie

Ainsi dans l'étude 1, après 3 semaines d'hypoxie à 10% d'oxygène (correspondant approximativement à 5500m d'altitude) nous ne retrouvons pas d'altération de l'activité CS, ni dans l'EDL, ni dans le SOL, alors que dans l'étude 3 après 6 semaines à 14% d'oxygène, une altération de l'activité CS dans le PLA est notée. Si la différence de sexe entre ces deux études est susceptible d'influencer le métabolisme spécifique des AG, il est peu probable qu'elle puisse modifier les capacités oxydatives globales à ce point. Compte tenu de l'hypoxie plus modérée de la dernière étude, mais d'une durée d'exposition plus longue, nous pouvons nous demander si l'altération aurait pu apparaître si nous avions prolongé le conditionnement de l'étude 1 jusqu'à 6 semaines d'exposition à l'hypoxie. L'étude de la transcription de PGC-1 $\alpha$  au cours de la cinétique d'exposition précoce à l'hypoxie (étude 2) peut d'ailleurs appuyer une telle hypothèse. En effet, l'expression du messenger PGC-1 $\alpha$  est induite après 6 heures d'hypoxie, alors qu'elle est diminuée à 7 jours par rapport au groupe apparié en prise alimentaire (au moins dans le SOL). Compte tenu de la demi-vie des mitochondries estimée à une quinzaine de jours, il est possible qu'à 3 semaines de conditionnement, nous observions encore les effets du pic transcriptionnel précoce de PGC-1 $\alpha$ , alors qu'à 6 semaines ceux-ci auraient disparu.

## 2.2 Rôle frénateur

Outre cet effet discuté, il faut prendre en compte les autres facteurs associés à l'exposition à l'hypoxie et pouvant par eux-mêmes modifier la biogenèse mitochondriale. En premier lieu, dans l'étude 3, l'entraînement réalisé en hypoxie, limite effectivement l'augmentation des capacités oxydatives enregistrée en normoxie. Pourtant, cette altération de la biogenèse à l'entraînement lors de l'exposition à l'hypoxie n'a pas été systématiquement retrouvée dans les travaux de notre équipe (Abdelmalki, et coll., 1996, Bigard, et coll., 1991) ou dans d'autres (Desplanches, et coll., 1993, Galbes, et coll., 2008).

Aussi, nous nous intéresserons à un autre facteur connu comme inducteur de la biogenèse mitochondriale : la restriction calorique (Nisoli, et coll., 2005). Si celle-ci est présente de façon marquée en début d'exposition à l'hypoxie (étude 2), elle se stabilise au bout d'une semaine autour d'une restriction modérée d'environ 15 à 25% pour une exposition à 5500m (étude 1). Pour une hypoxie plus modérée, chez des femelles, après une perte de poids initiale

fugace et modérée, les animaux retrouvent une prise alimentaire comparable aux animaux normoxiques (étude 3).

Si l'inhibition de l'expression de PGC-1 $\alpha$  après 7 jours d'hypoxie dans le SOL peut diminuer les stimuli activateurs de la biogenèse, il peut aussi exister en parallèle des stimuli activateurs de l'autophagie (Zhang and Ney, 2009, Zhang, et coll., 2007). Une étude récente a retrouvé l'augmentation des messagers pour le facteur mitophagique BNIP-3 dans le diaphragme à 7 jours d'exposition in vivo à une hypoxie à 10% d'oxygène {Gamboa, 2010 #273} qui se traduit à 4 semaines par une diminution du marquage pour la cytochrome C-oxydase, et de l'expression protéique des complexes II, IV et V de la chaîne respiratoire.

Comme dans notre étude 2, PGC-1 $\alpha$  n'avait pas été étudié en tant que marqueur de la biogenèse mitochondriale mais seulement comme cofacteur des PPARs, nous n'avions alors pas étudié les autres facteurs de la biogenèse tels que NRF-1 ou Tfam, ni les facteurs autophagiques tels BNIP-3.

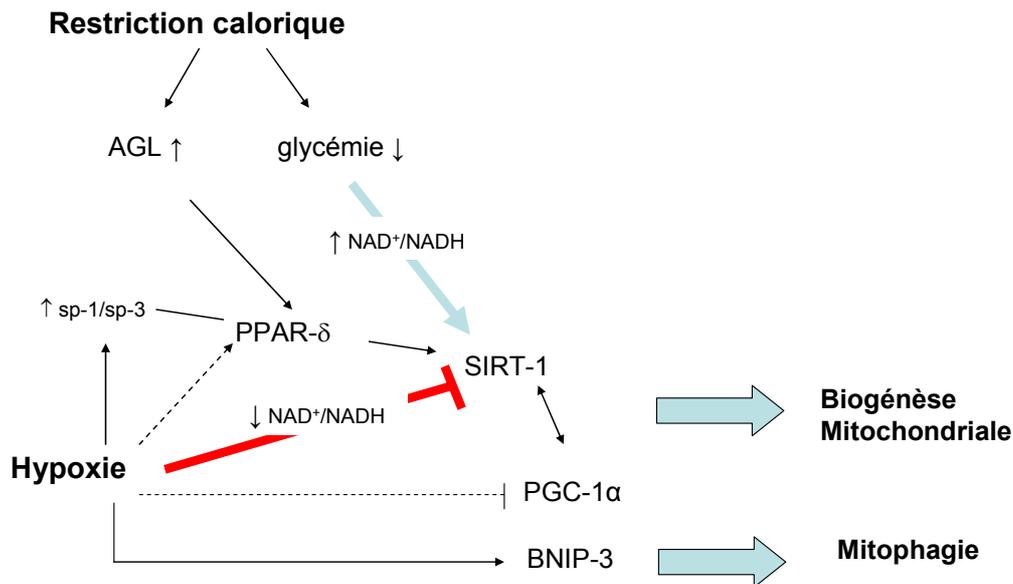
### 2.3 Schéma de synthèse

Nous proposons ici, un schéma intégré de la régulation de la biogenèse mitochondriale en hypoxie. La restriction calorique est activatrice des sirtuines {Finley, 2009 #272}, les baisses conjointes de la glycémie et de l'insulinémie diminuant le flux glycolytique et donc la production de NADH. L'induction de la voie du glycérol-3P (observée dans l'étude dans l'EDL des animaux *pairfed*), pourrait aussi participer à cette activation en augmentant la production de NAD<sup>+</sup>, généré lors de la formation du glycérol-3P à partir de la dihydroacétone.

Au contraire, l'hypoxie a été montrée comme potentiellement inhibitrice de Sirt-1 (Lim, et coll., 2010), notamment en augmentant la quantité de NADH présente dans le cytosol par une glycolyse accrue, alors qu'un frein sur l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie persiste et que les vitesses d'oxydo-réduction dans la chaîne respiratoire sont ralenties.

***Ainsi, si l'hypoxie peut limiter les effets inducteurs de la restriction calorique sur la biogenèse mitochondriale, inversement la restriction calorique spontanée indissociable de l'exposition in vivo à l'hypoxie sévère pourrait aussi limiter les éventuels effets délétères de l'hypoxie sur la biogenèse mitochondriale.***

Enfin, la facilitation de la voie Sp-1 décrite en hypoxie (Discher, et coll., 1998), associée à l'induction de PPAR- $\delta$  (observée dans l'étude 2) pourrait aussi constituer un facteur limitant les éventuels effets délétères de l'hypoxie sur la biogenèse mitochondriale. En effet, une activation de Sirt-1 par PPAR- $\delta$  impliquant la voie Sp-1 a récemment été décrite (Okazaki, et coll., 2010) (Figure 67).



**Figure 67:** interaction entre l'hypoxie et la restriction calorique : conséquences sur la densité mitochondriale

On voit ainsi la complexité de la situation qui dépend d'une part du type de réponse induite par l'hypoxie et donc évidemment de la sévérité de l'hypoxie, mais aussi du tissu concerné. Ainsi si la réponse à l'hypoxie active intensément la voie Sp-1 dans certains tissus, sans activation conséquente de la glycolyse, majoritairement dépendante de Hif-1 (ce que nous observons dans l'étude 2), il n'y aura pas de production excessive de NADH, susceptible de dépasser les capacités d'oxydo-réduction de la chaîne respiratoire, ce qui permettrait le maintien d'un équilibre de la balance entre les facteurs activateurs et inhibiteurs des sirtuines. On comprend mieux que les effets de l'hypoxie sur la densité mitochondriale puissent être variables en fonction des conditionnements, selon la sévérité de l'hypoxie appliquée, de la profondeur de l'anorexie induite, ou de l'importance des dépenses énergétiques issues d'une activité physique intense.

### 3. Utilisation des AG et hypoxie

Même si notre étude n'avait pas pour objectif principal de répondre à la question de l'utilisation préférentielle des substrats à l'hypoxie, nous avons malgré tout étudié les adaptations mitochondriales du muscle squelettique susceptibles de faciliter l'utilisation *in situ* des AG.

Ainsi, on retrouve dans l'étude 3, une **préservation relative de la  $\beta$ -oxydation** alors qu'on note parallèlement une amélioration relative de la respiration en complexe II.

Concernant le **transport membranaire** des AG, la littérature fait état d'une captation des AGL accrue dans le myocarde hypoxique (Chabowski, et coll., 2006) ; l'augmentation des messagers de Fat CD36 et FABP-3 obtenue dans notre étude 2, confirme cette variation.

Les études 1 et 3 confortent l'idée **d'une facilitation à l'utilisation mitochondriale du PC**. De plus, étant donné i) que l'activité 3-HAD était inchangée dans l'étude 1, alors que la  $V_{max}$  PC était augmentée, ii) qu'il a été montré le maintien de la  $V_{max}$  PC malgré une altération de 50% de l'activité 3-HAD (Galbes, et coll., 2008), le caractère limitant de cette enzyme dans l'oxydation des AGLC est remise en question, y compris pour un AG non dépendant du transport CPT-1. Conjointement à l'amélioration de l'affinité pour le PC, ces éléments nous semblent en faveur d'une amélioration portant sur les étapes de transport mitochondrial du PC regroupant les systèmes CAT et CPT-2.

L'étude 3 montre par contre clairement un **frein en amont sur le transport CPT-1**.

Aussi nous avons mis en évidence une facilitation à l'utilisation d'un AGLC indépendamment de CPT-1, mais subissant un frein en amont. Ceci n'est donc pas en soi un argument favorisant l'oxydation du palmitate, AGLC présent majoritairement dans le plasma, excepté peut-être pour un flux très sous-maximal de palmitate, comme ce peut être le cas dans une situation de repos. Ainsi, pour de faibles concentrations d'AG, le transport CPT-1 pourrait ne pas être limitant, comme l'évoque la comparaison des valeurs absolues des  $K_m$  pour le PC et le PCoA dans des PLA d'animaux témoins (respectivement :  $170 \pm 29$  et  $75 \pm 12$ ,  $P < 0,008$ ). De plus, nous restons interpellés par les données morphométriques de l'étude 1, dans laquelle une perte de masse grasse plus importante est observée chez les rats H, en comparaison des PF, après 3 semaines de conditionnement. Nous retrouvons ainsi ce qui avait été montré chez

l'homme, avec une perte de 5,8 kg dont 1,9 kg de masse grasse, alors qu'elle n'est que de 3,9 kg dont 1,7 kg de masse grasse en normoxie, avec une limitation des apports caloriques de 40% (Barnholt, et coll., 2006). Si le déplacement vers un métabolisme glucidique dans le myocarde ischémique est bien établi, la transposition d'un tel résultat au muscle squelettique est très probablement hâtive (Ou and Leiter, 2004). Tout au moins, il n'existe pas d'activation évidente de la glycolyse, ni facilitation du flux de pyruvate, alors qu'une activation de PPAR- $\delta$  précoce apparaît, associée à une surexpression transcriptionnelle des cibles impliquées dans le métabolisme des AG dans l'EDL et qui perdurent dans le SOL à 7 jours.

Clairement, ces données transcriptionnelles et de respiration mitochondriale *in situ* ne peuvent remplacer les techniques classiques de substrats marqués, qui restent les méthodes de référence pour l'étude du métabolisme *in vivo*. Cependant, elles fournissent des informations utiles concernant les adaptations mises en place au niveau des muscles squelettiques, tout au moins sur la potentialité de ce dernier à utiliser de façon préférentielle des AG.

#### 4. Rôle propre de l'hypoxie

Les trois études sont parfaitement cohérentes sur ce point. Les études 1 et 2 montrent, tant sur le plan fonctionnel que sur le plan transcriptionnel, un effet de l'hypoxie en partie médié par la restriction calorique, mais en partie seulement, en particulier dans l'EDL qui présente la réponse la plus marquée pour des gènes oxygène-sensibles. Quant à l'étude 3, où l'exposition à l'hypoxie ne s'accompagne d'aucune perte de poids par rapport à des animaux normoxiques *ad libitum*, on retrouve pourtant les mêmes tendances que dans l'étude 1.

### ***B. Conséquences métaboliques d'un agoniste PPAR- $\delta$***

#### 1. Conséquences fonctionnelles sur l'utilisation de substrat par la mitochondrie

##### 1.1 Transport membranaire

Hormis les données de la littérature, nous n'avons pas de preuve actuelle du lien unissant PPAR- $\delta$  à Fat CD36 ou FABP-3, ces cibles étant induites y compris chez les PF, qui ne présentent pas d'élévation des messagers PPAR- $\delta$ . Mais comme nous l'avons déjà dit, la simple élévation des AGL circulants dans ce groupe peut suffire à induire la transcription de ces gènes en activant ce facteur de transcription.

## 1.2 Transport CPT-1

L'étude 3 montre clairement une augmentation de l'efficacité catalytique du transport CPT-1 sous GW 742. Le GW 742 est par ailleurs capable d'augmenter les capacités oxydatives maximales pour le PCoA, ainsi que de limiter la baisse du flux sous-maximal en PCoA induite par l'entraînement. Néanmoins, malgré ces adaptations favorables, le GW 742 ne permet pas d'augmenter la respiration en PCoA de façon comparable à la potentialité de  $\beta$ -oxydation conférée par l'entraînement, ni la proportion des capacités oxydatives globales représentée par l'oxydation du PCoA.

## 1.3 Transport CAT et CPT-2

Le GW 742 permet d'augmenter l'oxydation maximale du PC, la part relative des capacités oxydatives globales fournie par ce substrat et aussi de limiter la baisse du flux sous-maximal en PC induite par l'entraînement.

Ces adaptations favorables sont telles que, sous GW 742, la respiration en PC augmente de façon quasi comparable à la potentialité de  $\beta$ -oxydation conférée par l'entraînement, le transport CPT-2 n'étant donc plus limitant en situation d'exercice.

## 1.4 $\beta$ -oxydation

Malgré l'absence d'effet sur l'activité 3-HAD, le GW 742 est tout de même capable d'augmenter les respirations en PC et PCoA, témoignant bien d'un effet ciblé sur le transport des AGLC plus que sur la  $\beta$ -oxydation intra-mitochondriale.

## 1.5 PDH

Outre l'effet facilitateur de nature et d'intensité différente concernant ces deux types d'AGLC, le GW 742 réduit la part représentée par l'oxydation du pyruvate dans les capacités oxydatives globales. Même si notre protocole n'a pas utilisé de dichloroacétate, activateur de la PDH, nous pouvons évoquer un frein à ce niveau. En effet, les transcrits PDK-4, mesurés dans l'étude 2 augmentent de façon proportionnelle aux transcrits PPAR- $\delta$ .

***Ainsi, le GW 742 améliore l'oxydation des AGLC en facilitant leur transport mitochondrial avec probablement un effet de nature quantitative sur CPT-2 et plutôt qualitatif sur CPT-1. Par ailleurs, le GW 742 ne présente pas d'effet majeur, que ce soit sur les capacités oxydatives globales, ou sur la  $\beta$ -oxydation intra-mitochondriale.***

***Pour préciser le lien entre la fonction mitochondriale étudiée ici et les acteurs moléculaires porteurs de ces adaptations, les cibles transcriptionnelles des PPARs dont CPT-2 et CAT sont actuellement en cours d'analyse par RT-PCR en temps réel.***

## 2. PPAR et phénotype musculaire

N'ayant testé qu'un seul muscle, le PLA dans le protocole GW 742, nous ne pouvons juger de la tissu-spécificité de la réponse aux agonistes PPAR- $\delta$ , les muscles glycolytiques étant classiquement meilleurs répondeurs (Cresser, et coll., 2010, Lunde, et coll., 2007, Narkar, et coll., 2008 ). Ceci est souvent attribué au fait que les agonistes PPAR- $\delta$  agissent en modifiant le phénotype musculaire vers un profil plus oxydatif (Lunde, et coll., 2007).

Cependant, dans notre étude, nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence une telle évolution sous traitement par GW 742, ni sur les capacités oxydatives globales (CS et Vmax non modifiées), ni sur l'index des créatine-kinases mitochondriales, ni sur la part de transport en PCoA inhibable par le malonyl-CoA, autant de facteurs connus comme caractéristiques du phénotype métabolique du muscle (Kim, et coll., 2002, Kuznetsov, et coll., 1996 ). Aussi, les seuls paramètres métaboliques modifiés par le GW 742 concernent les adaptations spécifiques de la balance AG-pyruvate.

Par ailleurs, l'absence de toute modification des capacités oxydatives sous GW 742 rend peu probable un effet inducteur de PPAR- $\delta$  sur la biogenèse mitochondriale. Même si ce point fait encore débat, avec notamment des études montrant aussi bien la correction d'une myopathie métabolique par un pan agoniste PPAR (Bastin, et coll., 2008, Wenz, et coll., 2008 ), que l'absence d'effet de PPAR- $\delta$  sur la biogenèse mitochondriale (Kleiner, et coll., 2009), notre étude conforte plutôt la dernière hypothèse et place ainsi le GW 742 comme un activateur sélectif du métabolisme des AG.

### 3. Rôle présumé des PPARs dans la situation d'hypoxie

#### 3.1 Réponse transcriptionnelle sur ces cibles

Le premier point est l'induction spécifique de PPAR- $\delta$  à l'hypoxie tant dans le muscle SOL que dans l'EDL, d'autant plus que les mouvements de PDK-4, de CPT-1 et d'UCP-3 dans l'EDL présentent une évolution similaire au messager PPAR- $\delta$  (étude 2).

#### 3.2 Aspect fonctionnel

Le peu de potentialisation entre hypoxie et GW 742 (étude 3) est remarquable et pourrait témoigner d'un certain degré d'activation PPAR- $\delta$  chez les animaux hypoxiques. Si l'on compare le groupe hypoxique sédentaire au groupe normoxique sédentaire traité au GW 742, les points de ressemblance sont nombreux, notamment sur la fonctionnalité CPT-2, bien que l'hypoxie semble avoir un effet davantage qualitatif et le GW 742, un effet quantitatif. Il existe cependant une différence notable sur l'efficacité catalytique de transport CPT-1 améliorée par le GW 742 mais altérée par l'hypoxie. Cette faible coopérativité traduit-elle l'activation d'une voie commune dans les deux situations ?

***Malgré une induction transcriptionnelle indéniable mais fugace à l'hypoxie, il est bien difficile de conclure au rôle fonctionnel de la voie PPAR- $\delta$  dans les adaptations métaboliques du muscle à l'hypoxie.***

### ***C. Enseignements tirés de la situation d'entraînement***

#### 1. Pourquoi ne peut-on utiliser des AG à haute intensité d'exercice ?

Cette question est fondamentale en physiologie de l'exercice, mais aussi chez des patients à qui on propose l'exercice physique comme moyen de réhabilitation et de mobilisation des graisses ; quelle est notre contribution à répondre à cette question ?

A l'exercice, chez un sujet sédentaire le point de croisement glucido-lipidique peut être estimé aux alentours de 65% de la puissance aérobie maximale : si 30% de cette énergie est fournie par les AG, cela représente déjà 94% de la  $V_{max}$  pour le PCoA obtenu pour une concentration subsaturante de 400 $\mu$ M. Ainsi, les capacités à générer de l'énergie avec les AG sont quasiment atteintes *in situ* et ne peuvent être que faiblement augmentées, même en

l'absence de compétition avec un substrat glucidique. Chez un sujet entraîné, du simple fait de l'augmentation des capacités oxydatives globales et même sans tenir compte d'un éventuel déplacement vers la droite du point de croisement glucido-lipidique, il est impossible de fournir seulement 30% de cette énergie par l'oxydation du PCoA.

De plus, à l'exercice, même si les muscles squelettiques constituent le principal consommateur d'énergie, le myocarde voit aussi sa charge de travail augmenter. Comme il consomme plus d'AG qu'un muscle squelettique, la part d'AG dévolue aux muscles squelettiques est peut-être un peu inférieure à celle évaluée par calorimétrie indirecte à l'échelle de l'organisme entier. Par contre, l'essentiel des muscles de l'organisme ayant un profil glyco-oxydatif et les muscles posturaux oxydatifs n'étant pas recrutés à la course, le comportement moyen de la masse musculaire locomotrice peut raisonnablement être extrapolé à partir des données obtenues sur le PLA.

Aussi, la première raison évidente pour laquelle il semble impossible d'atteindre  $VO_2\max$  en oxydant des AG résulte du constat qu'il est impossible d'atteindre la  $V_{\max}$  fibre avec un substrat lipidique. Au contraire, pour un PLA, la  $V_{\max}$  en pyruvate représente déjà 71% des capacités oxydatives maximales mesurées en glutamate-succinate. Enfin, plus l'intensité de l'exercice augmente, plus les fibres glycolytiques vont être recrutées or ce sont celles qui possèdent aussi la moindre grande propension à oxyder les AG.

Cependant, ce constat retrouvé *in situ* peut faire l'objet d'une analyse hiérarchisée et séparée des différentes étapes limitant l'oxydation des AG.

## 2. Quelles étapes limitantes *in situ* à l'oxydation des AGLC après entraînement ?

### 2.1 Transport CPT-1 et CPT-2

Une augmentation des capacités oxydatives globales et spécifiques d'une enzyme considérée comme limitante de la  $\beta$ -oxydation est enregistrée à l'entraînement. Aussi, le rapport entre les augmentations de l'activité CS et HAD à l'entraînement ne montre pas de défaut d'adaptation quantitative de la  $\beta$ -oxydation intra-mitochondriale. Nous pouvons donc affirmer que ces adaptations quantitatives globales ou spécifiques de la voie de la  $\beta$ -oxydation ne représentent par conséquent pas un facteur limitant. C'est ici que, faute de protocole avec une AGCC, la comparaison entre l'activité 3-HAD et les  $V_{\max}$  PC et PCOA est informative. Clairement, l'activité 3-HAD est augmentée par l'entraînement de façon même préférentielle par rapport aux enzymes du cycle de Krebs. Néanmoins, pour les deux AGLC utilisés dans notre étude, il

n'existe pas d'augmentation conjointe de leur vitesse maximale de respiration. Ainsi, il existe bien un frein sur le transport mitochondrial des AG même en aval de CPT-1. Ceci permet d'éclairer un point resté tout à fait intrigant dans l'étude de Koves (Koves, et coll., 2005) qui retrouvait une augmentation de l'oxydation en palmitate par unité de protéines mitochondriales en l'absence même d'augmentation d'activité CPT-1. Ayant vérifié l'intégrité de leurs membranes mitochondriales, il fallait bien conclure au fait que le transport CPT-1 n'était pas forcément l'étape limitante.

Néanmoins dans notre étude, le GW 742 levant quasi totalement le frein CPT-2, nous pouvons observer que persiste alors un verrou en amont.

*Alors que l'entraînement garantit une augmentation des capacités oxydatives globales et du potentiel de  $\beta$ -oxydation, il révèle l'existence de deux freins au transport des AGLC l'un sur CPT-1, l'autre en aval sur CAT ou CPT-2.*

*La potentialisation métabolique entre entraînement et GW 742 réside donc certainement sur des cibles d'action bien distinctes dans l'une et l'autre des situations. Ainsi alors que l'entraînement améliore essentiellement les capacités oxydatives globales et la  $\beta$ -oxydation intra-mitochondriale, le GW 742 facilite le transport du PCoA en restaurant l'affinité de CPT-1 et augmente les capacités de transport du PC.*

## 2.2 Co-transport Fat CD36

Par ailleurs, l'entraînement pourrait augmenter l'expression protéique de Fat CD36, favoriser sa translocation à la membrane mitochondriale (Talanian, et coll., 2010) et ainsi participer à l'amélioration de la capacité de transport maximal du PCoA. Cependant, nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence d'augmentation de ce transport maximal. Cependant, comme dans notre étude la fonctionnalité de ce dernier est indissociable du transport CPT-1 global, nous ne pouvons affirmer l'absence d'une amélioration de celui-ci qui compenserait une éventuelle altération du transport maximal CPT-1.

## III. Apport de nos travaux à la connaissance de la spécificité tissulaire

Notre étude s'est intéressée à plusieurs types de muscles squelettiques aux profils métaboliques distincts. Aussi, l'interprétation de l'ensemble de ces données nous apporte des

informations sur la tissu-spécificité de la réponse à une perturbation métabolique. De plus, la comparaison de ces différents muscles à l'état témoin est aussi informative de l'existence d'une tissu-spécificité à l'état basal. Comme nous allons le voir, l'étude en respiration *in situ* permet non seulement d'étudier des différences quantitatives liées à la densité mitochondriale, mais aussi de mettre en évidence des différences intrinsèques, approchées par l'expression relative des vitesses de respiration propres à chaque substrat, et rapportées à la vitesse maximale de respiration des fibres, ainsi que par l'étude de l'affinité pour les substrats.

Nous pensons que lorsque l'on s'intéresse aux adaptations quantitatives et qualitatives mitochondriales dans des situations perturbatrices, l'étude de la tissu-spécificité à l'état basal peut elle aussi fournir de multiples d'informations. En fait, l'étude de la tissu-spécificité à l'état témoin et des adaptations mitochondriales générées par une situation perturbatrice, constituent finalement deux façons distinctes d'aborder une même question. La part dévolue à la quantité de mitochondries présentes et celle liée aux propriétés intrinsèques ou aux adaptations qualitatives de cette population mitochondriale constituent par conséquent deux connaissances complémentaires.

Les données présentées ci-dessous sont encore partielles ; elles font l'objet de compléments d'expérimentations, compte tenu de l'intérêt présenté par cet abord fonctionnel de la spécificité tissulaire et des étapes limitantes de l'utilisation des AG en fonction du phénotype métabolique.

#### ***A. Capacités oxydatives maximales et spécificité tissulaire***

On peut observer dans le tableau 10 que les capacités oxydatives maximales sont tout à fait proportionnelles à l'activité CS mesurée dans chaque type muscle. De plus, la proportionnalité reste la même quel que soit le phénotype métabolique du muscle (Tableau 10,  $V_{max}/CS$  constant). Les données de la littérature présentées ci-contre montrent d'ailleurs qu'il n'existe aucune particularité intrinsèque des mitochondries de muscles rouges ou blancs pour l'activité citrate synthase (Tableau 10). De la même manière, pour les activités de l'ensemble des complexes de la chaîne respiratoire et de l'ATPsynthase, les différences observées entre type de muscle semblent essentiellement liées à des différences quantitatives sur la densité du réseau mitochondrial.

*Le seul paramètre métabolique qui semble entrer en ligne de compte pour déterminer les capacités oxydatives maximales est la densité mitochondriale propre à chaque type de muscle.*

	Etude 1		Etude 3
	SOL	EDL	PLA
CS	35,8 ± 1,5	28,0 ± 2,5	44,2 ± 0,9
3-HAD <sup>1</sup>	3,1 ± 0,2	1,3 ± 0,2	2,74 ± 0,2
3-HAD/CS*1000	87,1 ± 3,7	48,6 ± 4,8	61,7 ± 5,6
Vmax glut	6,8 ± 0,3	5,4 ± 0,2	9,6 ± 0,4
Vmax glut/CS	0,19	0,19	0,21
Vmax Pyr	6,9 ± 0,3	4,9 ± 0,2 <sup>2</sup>	8,7 ± 0,4
Vmax Pyr/ Vmax glutamate (%)	100,1 ± 1,4	92,6 ± 1,2 <sup>2</sup>	91,5 ± 0,8
Vmax PC	3,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	2,2 ± 0,2
Vmax PC/3-HAD	1,06	1,15	0,80
Vmax PC/ Vmax glutamate (%)	51,4 ± 2,3	24,8 ± 1,7	24,4 ± 2,2

**Tableau 10 :** comparaison des activités enzymatiques et des paramètres de la fonction mitochondriale pour différents substrats.

*Valeurs sous forme de moyenne ± sem. <sup>1</sup> Activité 3-HAD mesurée à +25°C ;*

*<sup>2</sup> calculé à partir d'un protocole cumulatif*

### ***B. Niveau maximal d'oxydation spécifique pour différents substrats et spécificité tissulaire***

1. Absence de modulation de l'oxydation maximale en pyruvate

Concernant l'oxydation relative en pyruvate, on observe qu'elle représente toujours un niveau élevé d'oxydation (>90% des capacités oxydatives maximales en glutamate). Ceci est en accord avec des résultats anciens qui rapportaient une utilisation du pyruvate similaire entre muscles oxydatifs et glycolytiques (Pande and Blanchaer, 1971). Ceci suggère que la pyruvate déshydrogénase n'est certainement pas un facteur limitant de la respiration mitochondriale à l'état témoin tout au moins *in situ*, ce qui n'exclut pas son rôle physiologique dans les variations nyctémérales et prandiales de l'utilisation de substrats *in vivo*.

## 2. Capacités de $\beta$ -oxydation mitochondriale et du transport indépendant de CPT-1

Par contre, il semble exister de véritables différences spécifiques sur la voie de la  $\beta$ -oxydation qui pourraient être liées à des différences plus qualitatives entre les mitochondries. Ainsi la proportion entre enzymes du cycle de Krebs et enzymes de la  $\beta$ -oxydation varie en fonction du phénotype métabolique musculaire (Tableau 10). L'étude de la littérature met d'ailleurs en évidence une véritable différence intrinsèque de l'activité 3-HAD au sein des mitochondries issues de muscles blancs ou rouges (Holloway, et coll., 2009, Leary, et coll., 2003). De plus, on peut noter que les différences observées sur la part relative représentée par l'oxydation maximale en PC entre les types de muscle est sensiblement du même ordre de grandeur que le rapport entre activité CS/HAD. Ainsi, le muscle SOL présente approximativement une  $V_{max}$  relative en PC 2 fois plus grande que celle d'un EDL ou d'un PLA. Enfin, la proportionnalité conservée entre  $V_{max}$  PC et activité 3-HAD (Tableau 10), quel que soit le phénotype, n'évoque pas de différence notable dans les capacités maximales de transport CAT/CPT-2 entre différents type de muscles.

***Ainsi, le niveau relatif d'oxydation en PC n'est pas simplement dicté par le contenu en mitochondries ; le facteur dimensionnant semblant être le rapport entre les activités HAD et CS c'est-à-dire entre capacités oxydatives globales et spécifiques des AG sans qu'il soit possible de mettre en évidence une limitation particulière au niveau du transport CAT-CPT-2 entre les différents phénotypes musculaires.***

## 3. Capacité maximale de transport intra-mitochondrial des AG

Des différences dans la part relative représentée par l'oxydation maximale du PC entre différents types de muscles squelettiques ont été observées. Il existe également une différence

du même ordre de grandeur pour la part relative représentée par l'oxydation maximale du PCoA (Tableau 11). Par contre, l'oxydation maximale relative du PC et du PCoA est assez semblable au sein de chaque type de muscle. Les rapports  $V_{\max}$  PC/ HAD et  $V_{\max}$  PCoA/HAD reste assez comparable pour un AGLC ou l'autre, au sein d'un muscle.

	Etude 3		Etude 1
	PLA	VD	Dia
3-HAD <sup>1</sup>	3,4 ± 0,2	77,3 ± 5,6	5,4 ± 0,2
$V_{\max}$ PC	2,2 ± 0,2	12,7 ± 1,0	3,0 ± 0,2
$V_{\max}$ PC/ $V_{\max}$ succinate	18,8 ± 2,2	38,1 ± 3,1	23,6 ± 2,6
KmPC	170 ± 29	111 ± 10	183 ± 27
$V_{\max}$ PC/3-HAD	0,64	0,16	0,61
$V_{\max}$ PCoA	2,61 ± 0,2	12,1 ± 0,8	2,7 ± 0,2
$V_{\max}$ PCoA/ $V_{\max}$ succinate	21,8 ± 2,3	40,9 ± 3,6	21,3 ± 4,3
Km PCoA	75 ± 12	29 ± 5	104 ± 4
$V_{\max}$ PCoA/3-HAD	0,76	0,15	0,50
Km PC/KmPCoA	2,3	3,8	1,8

**Tableau 11** : comparaison des niveaux d'oxydation absolus et relatifs et de l'affinité pour le palmitoyl-CoA dans le plantaris (PLA), le diaphragme(Dia) et le ventricule droit (VD).

*Valeurs sous forme de moyenne ± sem.*

<sup>1</sup> *Activité HAD mesurée à +30°C*

Là encore, nous ne sommes pas en mesure d'affirmer qu'il existe une véritable spécificité tissulaire de transport maximal pour les AGLC, les différences observées semblant expliquées en grande partie par les différences entre les activités 3-HAD.

D'ailleurs, les études sur mitochondries isolées sont encore discordantes concernant l'existence ou non d'une différence intrinsèque de l'activité CPT-1 entre types de muscle. Ainsi, Kim retrouve une activité CPT-1 plus importante dans les mitochondries de muscles rouges que blancs, alors qu'Holloway rapporte une activité tout à fait comparable (Holloway, et coll., 2009, Kim, et coll., 2002 ). Cependant, les adaptations mitochondriales observées à

l'entraînement et décrites ci-dessus, ne montraient qu'une augmentation de l'activité CPT-1 sur muscle entier, en rapport avec l'augmentation de la quantité de mitochondries mais aucune adaptation intrinsèque de l'activité CPT-1 sur mitochondries (Koves, et coll., 2005, Talanian, et coll., 2010). Ceci est cohérent avec un transport maximal CPT-1, qu'il soit constitutif du type de muscle ou adaptatif, suite à une situation métabolique perturbatrice, plutôt lié à la quantité de protéines présentes qu'à une modification de l'activité intrinsèque.

Alors que, comme nous venons de le voir pour l'ensemble des muscles squelettiques (ci-dessus pour l'EDL et le SOL, ci-contre pour le PLA et diaphragme), les  $V_{max}$  PC et PCoA rapportées à l'activité 3-HAD varient assez peu, ce rapport s'effondre dans le ventricule droit (VD) (Tableau 11) Ceci traduit une activité HAD d'autant moins limitante des capacités oxydatives dans le cœur que dans un muscle squelettique et, *a contrario*, une étape de transport des AGLC d'autant plus limitante au regard des possibilités de  $\beta$ -oxydation.

### **C. Sensibilité aux AGLC**

#### 1. Affinité pour le PC et PCoA et type de muscle

Peut-être pour limiter le frein sur le transport des AGLC par rapport au potentiel considérable fourni par l'activité 3-HAD, on observe un  $K_m$  pour le PCoA très inférieur dans le VD comparé aux muscles squelettiques, alors que le  $K_m$  pour le PC varie relativement peu (Tableau 11). Aussi les différences d'affinité pour le PCoA entre muscles pourraient constituer le facteur dimensionnant et représentatif de la facilité à oxyder le PCoA au repos. Ainsi les AG fournissent 90 % de l'énergie consommée par un cœur au repos alors qu'ils ne représentent qu'au mieux 40% pour un muscle squelettique oxydatif, enregistré à distance de la prise d'un repas.

Par ailleurs, nous pouvons observer que dans un PLA contrôle, l'affinité pour le PCoA est environ deux fois supérieure à l'affinité pour le PC. Quoique cette facilitation du substrat physiologique par rapport à un substrat extraphysiologique soit rassurante, nous ne pouvons nous contenter d'une remarque aussi finaliste à cette observation plutôt inattendue. Or des études structurelles de l'équipe de Zammit ont pu montrer que l'environnement autour de CPT-1 pouvait moduler la fonctionnalité CPT-1. Ils ont ainsi mis en évidence des « sites de contact » privilégiés entre membrane externe et membrane interne mitochondriale (Fraser and Zammit, 1998). Ces zones de contact peuvent faciliter ici l'interaction entre CPT-1 et CPT-2, créant un chemin plus direct et déjà orienté à travers la membrane mitochondriale pour le

PCoA, alors que le PC exogène, bien qu'il diffuse à travers la membrane externe mitochondriale, ne bénéficiera pas de ce « jalonnage ». Enfin, cette interaction structurelle est capable de moduler la fonctionnalité CPT-1. Ainsi, l'affinité pour le PCoA est augmentée dans les zones de contact entre CPT-1 et membrane interne par rapport aux zones où la membrane externe est à distance (Fraser, et coll., 2001). Par ce double processus, impliquant la modulation de la fonction CTP-1 et facilitant le transport de PC issu de l'action de CPT-1 vers CPT-2, on peut comprendre comment l'affinité pour le PCoA peut-être améliorée en comparaison de celle pour le PC.

Enfin, la découverte récente par l'équipe de Bonen d'un cotransport du PCoA a encore complexifié le schéma de transport des AGLC dans la mitochondrie. Ainsi, depuis 2004, nous savons que le transporteur Fat CD36 peut être transloqué au niveau de la membrane mitochondriale (Campbell, et coll., 2004). Or, la technique de co-immunoprécipitation a montré une interaction étroite entre CPT-1 et Fat CD36 qui pourrait là encore « guider » directement le PC formé dans l'espace intermembranaire par CPT-1 directement vers CPT-2 (Bezaire, et coll., 2006, Campbell, et coll., 2004). Cette équipe a récemment montré qu'il pouvait exister une spécificité tissulaire de l'expression protéique mitochondriale de Fat CD36 (Holloway, et coll., 2009). Ceci peut participer à améliorer l'affinité pour le PCoA dans les muscles oxydatifs. Ceci peut aussi accentuer du même coup la différence entre l'affinité pour le PCoA et le PC exogène, ce dernier ne bénéficiant pas de la facilitation par ce cotransport Fat CD36 accru.

Enfin, la comparaison du rapport des Km entre muscles laisse apparaître une facilitation nettement plus importante pour le transport du PCoA dans le cœur, comparativement à l'affinité pour le PC. Ceci pourrait contribuer à limiter un peu moins le transport du palmitate et à optimiser un peu plus le potentiel de  $\beta$ -oxydation du myocarde.

Si nous montrons ici que peut exister une modulation de l'affinité pour le substrat, comme cela avait déjà été suggéré (Ponsot, et coll., 2005), reste à proposer les bases structurelles pouvant supporter ces adaptations.

## 2. Inhibition par le malonyl-CoA et type de muscle

Nous avons montré dans l'étude 3, que le malonyl-CoA n'inhibait qu'à hauteur de 50% la respiration en PCoA dans le muscle PLA. Ceci est intermédiaire entre ce qui avait été montré dans un SOL et un EDL où respectivement 40% et 60% de l'activité CPT-1 est inhibable par le malonyl-CoA (Kim, et coll., 2002), ce qui est cohérent avec le phénotype métabolique de ces muscles.

#### ***D. Expression des PPARs et orientation de substrats***

Même s'il est classiquement décrit dans la littérature une expression de PPAR- $\delta$  plus importante dans un muscle oxydatif que dans un muscle glycolytique, la différence n'est pas clairement retrouvée ici entre EDL et SOL (Tableau 12). Quant à PPAR- $\alpha$ , il est curieusement deux fois plus exprimé dans l'EDL que dans le SOL témoin. Ceci est à l'inverse du rapport de l'activité 3-HAD observée dans ces deux muscles. Or, si le rôle de PPAR- $\alpha$  sur l'orientation des substrats n'est que peu probable, son expression est par contre habituellement corrélée aux capacités de  $\beta$ -oxydation du tissu (Bedu, et coll., 2007). Ce résultat sera donc à confirmer avec un autre couple d'amorces, dessinées dans une zone différente du messageur PPAR- $\alpha$ .

	Etude 2	
	EDL	SOL
Ratio ARNm UCP-3 EDL/SOL	1,18	
Ratio ARNm PPAR- $\delta$ EDL/SOL	0,83	
Ratio ARNm PPAR- $\alpha$ EDL/SOL	2	
Ratio PPAR- $\alpha$ /PPAR- $\delta$	3,26	1,22

**Tableau 12 :** comparaison des niveaux d'expression des ARN messagers PPARs et UCP-3, dans un muscle oxydatif (SOL) et un muscle glycolytique (EDL).

*Valeurs sous forme de moyenne  $\pm$  sem.*

### ***E. Composition membranaire et orientation de substrat***

La fluidité membranaire et la conductance protonique des mitochondries ont pu être analysées comme différentes entre muscles rouges et blancs (Leary, et coll., 2003) et pourraient aussi jouer un rôle dans l'orientation de substrats par des mécanismes que nous expliquerons ci-dessous.

#### 1. Fluidité membranaire

Nous avons rappelé l'importance des interactions entre les membranes mitochondriales externes et internes. Cette notion n'est pas indépendante de la composition membranaire et notamment de sa fluidité. D'ailleurs, les modulations de la fonctionnalité CPT-1 et de la sensibilité au malonyl-CoA au cours du jeûne, d'un régime hyperlipidique ou chez le diabétique ont pu être reliées à des changements de la composition de la membrane externe mitochondriale (Zammit, 1996). Plus récemment, et même si l'extrapolation au mammifère doit être prudente, il a été montré dans le foie de truite qu'il existait une corrélation étroite entre le pouvoir inhibiteur du malonyl-CoA sur l'activité CPT-1 et la fluidité des membranes mitochondriales (Morash, et coll., 2008). Ceci est cohérent avec l'hypothèse d'interaction étroite CPT-1/CPT-2 qui nécessite une certaine fluidité membranaire pour s'établir et qui limiterait l'effet inhibiteur du malonyl-CoA, notamment par une inhibition devenue compétitrice du substrat, le PCoA (Fraser, et coll., 2001). Par ailleurs, cette augmentation de la fluidité membranaire supprime l'interaction de proximité entre les extrémités N et C-terminales de CPT-1, interaction responsable de la sensibilité au malonyl-CoA (Faye, et coll., 2005). La fluidité membranaire pourrait donc moduler la sensibilité au malonyl-CoA, à la fois par le jeu d'interactions intramoléculaires mais aussi extra-moléculaires. Même si ces données ne sont pour l'instant disponibles que pour la forme hépatique de CPT-1, une modulation de même ordre est envisageable pour la forme musculaire.

Le niveau d'expression de certaines protéines de la membrane mitochondriale pourrait également jouer un rôle dans le phénotype métabolique des types de muscle.

## 2. Expression d'UCP-3

### 2.1 Niveau d'expression d'UCP-3 dans l'EDL et le SOL

Nous avons déjà explicité en introduction le rôle possible d'UCP-3 dans l'orientation de substrat, via notamment la modulation du potentiel de membrane mitochondriale. Cependant le niveau d'expression est décrit par deux équipes comme plus important dans un muscle glycolytique que dans un muscle oxydatif (Hesselink, et coll., 2001, Jimenez, et coll., 2002). Dans l'étude 2, nous ne mettons pas en évidence de tissu-spécificité de l'expression basale du messenger UCP-3 (Tableau 12). Ceci ne peut donc rendre compte de la tissu-spécificité observée pour l'oxydation du palmitate et indépendante de la quantité de mitochondrie. Cependant même si, à l'état témoin, le niveau d'expression basale d'UCP-3 n'est pas impliqué dans le phénotype métabolique, cela n'exclut pas son rôle dans les réponses adaptatives environnementales et nutritionnelles.

### 2.2 Réponse d'UCP-3 au cours de l'exposition à l'hypoxie

On sait qu'il existe un lien entre l'augmentation de la disponibilité en AGL lors du jeûne et l'induction d'UCP-3, exclusivement dans les muscles oxydatifs. Ceci accrédite tout de même un rôle dans l'oxydation accrue des AG dans cette situation et dans ce type de muscle (Samec, et coll., 1998). Par ailleurs, notre étude suggère un effet inducteur propre de l'hypoxie dans un muscle glycolytique et indépendamment des AGL circulants. Si nous étudions l'évolution des rapports de l'expression d'UCP-3 dans l'EDL et le SOL au cours de l'exposition à l'hypoxie, nous voyons clairement la tissu-spécificité de la réponse. En effet à 6h d'hypoxie, le rapport est porté à un facteur 8, puis redescend à 4 à 24h pour finalement se normaliser et revenir à son niveau témoin à 7 jours. Alors que ces 2 muscles sont soumis au même environnement en AGL, clairement nous pouvons affirmer que dans l'EDL, UCP-3 répond à l'hypoxie, alors que dans le SOL, ce gène répond à la restriction calorique.

Cependant nous ne pouvons établir de lien de cause à effet entre cette observation précoce et le tableau fonctionnel concernant la facilitation à l'oxydation du PC après 21 jours d'hypoxie dans le muscle EDL (étude 1).

## **IV Apport de nos travaux à une réflexion thérapeutique.**

L'augmentation de la prévalence de nombreuses pathologies chroniques au coût sociétal important a conduit à proposer de nouvelles conduites préventives et thérapeutiques ; au

premier rang de ces pathologies, on place la surcharge pondérale et l'obésité. Parmi les nouvelles approches de prévention et/ou de traitement, l'émergence de nouvelles thérapeutiques et la promotion de l'activité physique jouent un rôle non-négligeable.

Nos résultats expérimentaux abordent les effets de l'hypoxie, de l'activité physique régulière et d'une nouvelle classe thérapeutique (agonistes PPAR $\alpha$ ) sur l'oxydation des acides gras. Ce contexte expérimental trouve une application potentielle aux situations de dys-utilisation des acides gras et de surcharge pondérale. C'est la raison pour laquelle il nous a paru intéressant d'envisager quelles applications potentielles de ces résultats fondamentaux on pouvait envisager dans le cadre de dysmétabolismes et d'états de surcharge pondérale.

### ***A. Dissociation de la régulation entre flux en AG et capacités oxydatives***

#### **1. Lipotoxicité et insulino-résistance : de l'obésité au diabète**

##### **1.1 L'obésité : une pathologie mitochondriale ?**

L'obésité a parfois été considérée comme une pathologie mitochondriale. En effet certaines études montrent que les capacités oxydatives maximales pourraient être diminuées chez l'obèse, par contre d'autres études ne retrouvent aucune altération des capacités oxydatives maximales (Holloway, et coll., 2009). Aussi, force est de constater que le métabolisme maximal est très largement supérieur aux besoins d'un métabolisme de repos. Alors que pour le sportif en compétition cette capacité maximale pourrait être un facteur limitant, son retentissement pathologique chez un sujet est peu probable (Holloszy, 2009). Excepté pour les anomalies primitives de la fonction mitochondriale à l'origine de divers tableaux de myopathies ou pour l'insuffisance cardiaque, le déficit quantitatif en mitochondries n'est que rarement à l'origine d'une pathologie. Ainsi, malgré des débats encore vifs, l'hypothèse étiologique de l'insuffisance mitochondriale dans le développement du diabète ou de l'obésité ne semble pas confirmée (Holloszy, 2009, Holloway, et coll., 2009, Schrauwen, et coll., 2002)

Par contre, le rôle joué par les mitochondries du muscle squelettique dans l'orientation métabolique pourrait participer au développement d'un syndrome métabolique (Hue and Taegtmeyer, 2009, Kelley, et coll., 2000, Thyfault, et coll., 2006) d'une part du fait de l'importance quantitative représentée par le métabolisme énergétique de la masse musculaire et d'autre part, en tant qu'organe insulino-sensible, responsable de 90% de la captation

insulino-dépendante du glucose. Qui plus est, le muscle squelettique représente de plus une cible interventionnelle et thérapeutique de première ligne.

### 1.2 Notion de lipotoxicité et insulino-résistance

Nous ne reviendrons pas sur l'éternel débat, encore non résolu, du lien - cause ou conséquence - entre la myopathie métabolique et le diabète de type 2 (Schrauwen, et coll., 2002), Boushel). Par contre, la captation accrue des lipides et leur accumulation est une constante dans cette pathologie. Or, lorsque les TG et surtout les céramides s'accumulent dans le muscle, ceux-ci participent à l'altération de l'insulino-sensibilité par des mécanismes assez complexes d'interaction avec la signalisation intracellulaire de l'insuline. Ce schéma est connu sous le terme de « lipotoxicité » qui est un facteur d'aggravation de l'insulino-résistance (Delarue and Magnan, 2007). Preuve en est l'amélioration souvent spectaculaire des glycémies lors d'un régime pauvre en graisse, mais qui paraît toujours utopique au patient diabétique qui se représente « avoir trop de sucre dans le sang » mais pas trop de graisses dans les muscles.

### 1.3 De l'obésité au diabète

Si nous avons rejeté ci-dessus le rôle d'une altération quantitative de la fonction mitochondriale dans la physiopathologie du diabète, il existe probablement une altération qualitative, avec non seulement une captation accrue des AGL par la fibre musculaire, mais aussi une orientation vers le stockage plutôt que l'oxydation. Plus qu'une altération intrinsèque primitive de la capacité à oxyder les AG, il s'agit d'une inadéquation entre l'augmentation très importante du flux entrant d'AG et des capacités de  $\beta$ -oxydation qui ne subissent pas d'augmentation suffisamment conséquente pour faire face à cet afflux qui est alors dérivé vers une voie de stockage (Holloway, et coll., 2009).

## 2. Hypothèse réconciliatrice

Une inadéquation entre capacités oxydatives globales et spécifiques de la  $\beta$ -oxydation a récemment été proposée (Muio and Koves, 2007) et constitue une hypothèse alternative à celle basée sur une dissociation du flux entrant d'AG et des capacités de  $\beta$ -oxydation.

Ainsi, on pourrait résumer la question à un problème de proportionnalité des effets sur le transport d'AG, leur  $\beta$ -oxydation d'une part et le cycle de Krebs d'autre part. Outre l'accumulation des lipides, dont nous avons parlé ci-dessus, l'excès de produits intermédiaires

de la  $\beta$ -oxydation issus d'un processus d'oxydation incomplet peut également générer une insulino-résistance (Koves, et coll., 2008). Toute dissociation aboutissant à une augmentation du transport des AG plus importante que celle des capacités oxydatives en aval, pourrait générer le développement d'un tableau métabolique complexe par lipotoxicité directe et indirecte, et insulino-résistance (Holloway, et coll., 2009, Koves, et coll., 2008). Aussi, plus que l'accumulation des AG en soi, c'est bien au regard des capacités oxydatives globales qu'il faut juger de leur aspect pathologique ou non. Une illustration assez évidente est le stock en triglycérides intramusculaires (IMTG) augmenté tant chez le sportif très entraîné que chez le diabétique, et associé chez le premier à un état d'insulino-sensibilité amélioré et chez le second à un état d'insulino-résistance. La différence essentielle entre ces 2 tableaux réside dans le niveau des capacités oxydatives globales en harmonie avec le stock d'IMTG chez le sportif, alors que largement sous-dimensionné chez le diabétique.

*Il existerait donc une inadéquation entre adaptations quantitatives mitochondriales et qualitatives associant une double problématique : l'une spécifique de la voie de la  $\beta$ -oxydation et l'autre aspécifique, concernant les capacités oxydatives globales.*

## **B Associer les bénéfices quantitatifs et qualitatifs ?**

### 1. Coopérativité PGC-1 $\alpha$ et PPAR

#### 1.1 Entre biogenèse mitochondriale et $\beta$ -oxydation

##### a) PGC-1 $\alpha$ et orientation de substrat ?

Alors que les modèles déficients pour PGC-1 $\alpha$  n'existent encore qu'à l'échelle de l'organisme entier, dernièrement l'apparition de modèles transgéniques sur-exprimant spécifiquement PGC-1 $\alpha$  dans le muscle a permis de progresser dans la compréhension du rôle métabolique joué par PGC-1 $\alpha$  au niveau du muscle squelettique, indépendamment d'un biais des effets hépatiques et notamment de l'impossibilité d'une néoglucogenèse en l'absence d'expression de PGC-1 $\alpha$ .

#### **Epargne de glycogène**

Avec un tel modèle, une moindre utilisation du glycogène musculaire au cours de l'exercice a pu être montrée, avec une vitesse de reconstitution accrue des stocks musculaires en glycogène à l'arrêt de l'exercice. Cependant les analyses montrent qu'il s'agit en fait d'une diminution de la glycolyse, associée à une activation de la glycogénèse. Il n'y a donc pas d'activation directe de l'oxydation des AG, mais simplement compensation biochimique par défaut d'utilisation du glucose (cf cycle de Randle). D'ailleurs, même à faible intensité de course, alors que le métabolisme des AG est essentiel, il n'existe aucune amélioration de la performance (Wende, et coll., 2007).

#### **PGC-1 $\alpha$ et $\beta$ -oxydation**

Dans un autre modèle de surexpression de PGC-1 $\alpha$  par transfection dans le *tibialis* antérieur, Benton retrouve une augmentation de l'oxydation du palmitate dans les mitochondries sous-sarcolemmales ; cependant l'absence de protocole de respiration réalisé avec un substrat non lipidique nous prive de conclusion (Benton, et coll., 2008). De plus, alors que d'autres études sur cultures cellulaires avaient pu mettre en évidence une induction transcriptionnelle de CPT-1 par PGC-1 $\alpha$  (Kleiner, et coll., 2009, Koves, et coll., 2005), Benton ne retrouve *in vivo* aucune augmentation de l'activité enzymatique de CPT-1.

**PGC-1 et activité de la PDH :**

De plus, une activation de PDK-4 avec inhibition de la PDH avait été trouvée *in vitro* (Koves, et coll., 2005 , Wende, et coll., 2005) ; tout effet de PGC-1 $\alpha$  sur la modulation de l'activité PDH en situation de jeûne ou d'exercice a pu être écartée très récemment (Kiilerich, et coll., 2010).

***De notre point de vue, PGC-1 $\alpha$  ne peut seul définir une oxydation préférentielle entre glucose et AG, mais reste évidemment essentiel au maintien des capacités oxydatives globales et en particulier à l'oxydation complète des AGLC.***

Concernant le métabolisme cardiaque, il est essentiel de garantir la fonction contractile et donc les capacités métaboliques et ce, quelle que soit la nature du substrat oxydé (van Bilsen, et coll., 2009) ; la stimulation de PGC-1 $\alpha$  reste donc primordiale. Pour ce qui est du muscle squelettique, la problématique est évidemment différente puisque, plus que la fonction contractile à préserver, il s'agit de garantir une fonction métabolique qui participe pour bonne part au métabolisme de repos. Ici, garantir une oxydation harmonieuse du flux entrant d'AG, tout en augmentant la seule dépense énergétique modulable physiologiquement et volontairement par le niveau d'activité physique, reste l'objectif majeur.

b) PPAR- $\delta$  et biogenèse mitochondriale

*In vitro*, il a pu être montré un effet propre PPAR- $\delta$  sur la transcription de PGC-1 $\alpha$  indépendamment de tout effet médié par PPAR- $\alpha$  (Hondares, et coll., 2007). Comme nous l'avons discuté dans le paragraphe concernant les effets du GW 742 sur la biogenèse mitochondriale, la question est loin d'être résolue (Grimaldi, 2010). Ainsi, dans un modèle de souris déficiente pour PPAR- $\delta$  de façon muscle spécifique, un effondrement des capacités oxydatives musculaires est mis en évidence, aboutissant à un tableau de myopathie métabolique avec développement d'un syndrome métabolique systémique (Schuler, et coll., 2006) ; à l'opposé, une autre étude montre l'absolue nécessité de PGC-1 $\alpha$  pour la pleine expression des effets d'un activateur PPAR- $\delta$  sur ses cibles transcriptionnelles, alors que PGC-1 $\alpha$  peut exercer son action sur la biogenèse mitochondriale et sur l'oxydation des AG indépendamment de PPAR- $\delta$  (Kleiner, et coll., 2009). Ainsi entre l'utilisation de pan-agoniste PPAR en thérapeutique pour une myopathie mitochondriale (Bastin, et coll., 2008 ,

Bonnefont, et coll., 2009, Wenz, et coll., 2008 ) et un modèle de souris déficiente pour PPAR- $\alpha$  et PPAR- $\delta$  présentant seulement une altération modérée d'activité HAD (Bedu, et coll., 2007), le hiatus est un peu déroutant.

Quoi qu'il en soit, même si PPAR- $\delta$  n'est pas absolument nécessaire à l'oxydation du palmitate, son rôle propre facilitant spécifiquement l'oxydation du palmitate fait désormais peu de doute ainsi que sa synergie positive sur PGC-1  $\alpha$  (Kleiner, et coll., 2009).

Nous voyons se réconcilier ici nos deux problématiques, un peu artificiellement séparées pour les illustrations pathologiques. Aussi, la nécessité de prendre en compte simultanément les adaptations mitochondriales qualitatives, spécifiques des AG et les adaptations mitochondriales purement quantitatives garantes des capacités oxydatives globales, apparaît clairement. Plus que le titre provocateur du papier de Narkar, laissant à penser qu'un agoniste PPAR- $\delta$  pourrait mimer les effets de l'exercice, ces résultats montrent au contraire la nécessité absolue d'associer les deux, pour améliorer la performance (Narkar, et coll., 2008).

## 1.2 Interactions entre ces deux acteurs

Il existe des bases moléculaires de mieux en mieux connues explicitant cette interaction PPAR- $\delta$ /PGC-1 $\alpha$ .

### a) La co-régulation transcriptionnelle

Alors qu'historiquement PGC-1 $\alpha$  était connu comme le cofacteur de PPAR- $\gamma$ , la première interaction de PPAR- $\delta$  avec PGC-1 $\alpha$  a été décrite en 2003, lorsqu'est mise en évidence la co-immunoprécipitation de ces deux facteurs avec une induction transcriptionnelle de PGC-1 $\alpha$  (Wang, et coll., 2003).

Depuis, cette interaction a été retrouvée et associée à l'existence d'une co-régulation transcriptionnelle *in vitro*, les deux facteurs étant capables de s'induire mutuellement l'un l'autre par une boucle d'autorégulation positive (Hondares, et coll., 2007).

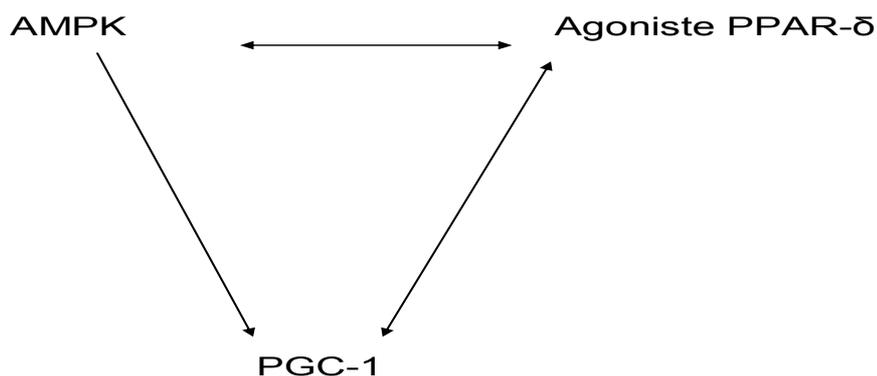
Néanmoins, *in vivo*, les choses sont moins évidentes. Ainsi, sur muscle entier de souris transgéniques sur-exprimant PPAR- $\delta$ , Wang n'a pas retrouvé (Wang, et coll., 2004) le résultat obtenu sur culture cellulaire (Wang, et coll., 2003). Par contre, il semble exister une régulation post-transcriptionnelle de PPAR- $\delta$  sur PGC-1 $\alpha$  mise en évidence chez des rats soumis à un régime riche en graisses (Hancock, et coll., 2008).

Outre ces interrelations entre PPAR- $\delta$  et PGC-1 $\alpha$ , les conséquences transcriptionnelles de l'activation isolée de l'un, l'autre ou de ces deux facteurs ont pu être proposées (Koves, et coll., 2005). Ainsi, l'association d'un régime riche en graisses à un modèle de sur-expression de PGC-1 $\alpha$  muscle spécifique permet d'identifier trois groupes de gènes : UCP-2 et 3 répondant exclusivement à PPAR- $\delta$ , les enzymes du cycle de Krebs et de la  $\beta$ -oxydation répondant exclusivement à PGC-1 $\alpha$ , alors que CPT-1 et PDK-4 répondent de façon synergique à la co-activation PGC-1 $\alpha$ /PPAR (Koves, et coll., 2005).

b) AMPK-PGC-1 $\alpha$ -PPAR- $\delta$

Récemment, un autre acteur s'est invité dans cette co-régulation : l'AMPK. En effet, outre le profil transcriptionnel particulier généré par l'adjonction d'un traitement par GW 501516 à de l'AICAR, un activateur de l'AMPK, il existe une co-immunoprécipitation de ces trois éléments (Narkar, et coll., 2008).

Ainsi, outre l'activation déjà connue de PGC-1 $\alpha$  par l'AMPK sur le plan transcriptionnel (Terada, et coll., 2002) et post-transcriptionnel (Jager, et coll., 2007), l'interrelation entre ces trois acteurs a fait l'objet d'une récente revue de littérature (Lee and Kim, 2010) (Figure 68)



**Figure 68** : interrelation envisagée entre AMPK, PGC-1 $\alpha$  et PPAR- $\delta$

***Même si PPAR- $\delta$  est par lui-même insuffisant pour induire une biogenèse mitochondriale, il est capable d'orienter l'utilisation des substrats vers les AG. En miroir, il semble peu probable que l'AMPK ou PGC-1 $\alpha$  puissent seuls jouer un rôle dans l'orientation métabolique et le choix des substrats oxydés, mais ils participent indéniablement à une biogenèse mitochondriale efficace. Aussi, l'association de ces différents acteurs pour augmenter l'oxydation des AG semble donc particulièrement recommandé, d'autant plus qu'existe une synergie entre ces différents facteurs lorsqu'ils sont activés simultanément.***

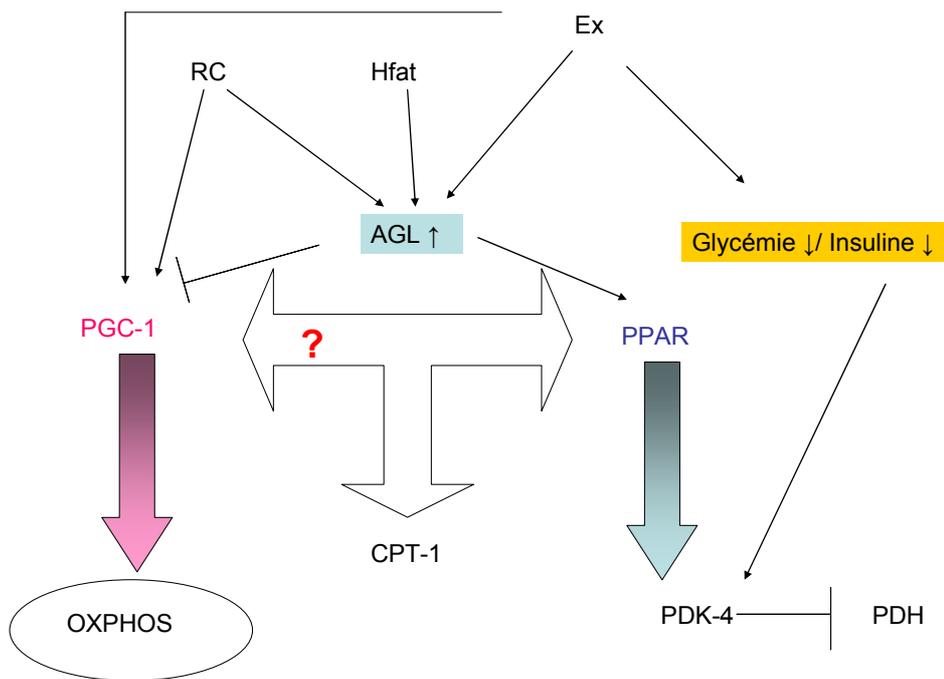
## 2. Situations de dysrégulation ou de corégulation

Pour mieux comprendre la nécessité d'une co-régulation harmonieuse entre ces facteurs nous allons illustrer les conséquences de trois situations différentes ayant en commun une élévation des AGL plasmatiques, induisant donc potentiellement PPAR- $\delta$ , mais présentant des degrés d'activation de PGC-1 $\alpha$  ainsi que des variations du couple glycémie/insuline bien différents :

- Premièrement, le régime riche en graisses (HFat) ne s'accompagne d'aucune induction avérée de PGC-1 $\alpha$ , bien que, sur ce point, une controverse persiste entre l'équipe d'Hollozy, pour lequel un effet inducteur pourrait exister (Garcia-Roves, et coll., 2007, Hancock, et coll., 2008), et la majorité des autres équipes, lesquelles retrouvent une inhibition de PGC-1 $\alpha$  ((Richardson, et coll., 2005, Sparks, et coll., 2005).
- Deuxièmement, la situation de restriction calorique, comme nous l'avons dit précédemment, pourrait participer à une induction de PGC-1 $\alpha$ , mais modérée cependant.
- Enfin, la situation d'exercice, dans laquelle existe une induction puissante et durable de PGC-1 $\alpha$

La Figure 69 représente les conséquences d'une augmentation de la disponibilité en lipides selon que PGC-1 $\alpha$  est activé ou non. Ainsi dans tous les cas, il existe une induction de la voie PPAR par ces ligands naturels, aboutissant à une activation de PDK-4 et de CPT-1, favorisant donc un flux mitochondrial d'AG aux dépens de glucose. Si cette augmentation de flux d'acylCoA ne s'accompagne pas d'une augmentation comparable des capacités de phosphorylation oxydative, alors une accumulation de ceux-ci ou de produits dégradés peut survenir, générant une lipotoxicité mitochondriale. Si PGC-1 $\alpha$  était seul activé, sa capacité à activer CPT-1 et PDK-4 serait probablement insuffisante pour augmenter de façon

préférentielle l'oxydation des AG. C'est ce qu'observe Wende dans un modèle de souris sur-exprimant PGC-1 $\alpha$  dans le muscle, qui malgré une épargne de glycogène musculaire et des capacités oxydatives accrues, sont incapables d'augmenter leur oxydation d'AG pour améliorer leur performance à l'exercice (Wende, et coll., 2007).



**Figure 69** : effets distincts de trois situations (RC, Hfat et Ex) s'accompagnant d'une augmentation de la disponibilité en AGL.

### C. Réflexions sur l'application à la prise en charge du syndrome métabolique

Si tant est que, ainsi que nous l'avons dit précédemment, les effets respectifs de PGC-1 $\alpha$  et PPAR- $\delta$  ne sont pas encore clairs, notamment en ce qui concerne leurs relations de coopérativité, il semble licite de ne pas stimuler de façon disproportionnée la voie PPAR- $\delta$  sans activation concomitante et suffisante de PGC-1 $\alpha$ .

#### 1. Les dangers potentiels d'un agoniste pharmacologique de PPAR- $\delta$

Il apparaît potentiellement dangereux d'augmenter sélectivement la voie PPAR- $\delta$  en la dissociant d'une activation de la biogenèse mitochondriale. Deux équipes, celles de Bonen

(Cresser, et coll., 2010) et Muoio (Koves, et coll., 2008), ont récemment participé à cette mise en garde et ont pu montrer le risque de développer une insulino-résistance périphérique, même si les mécanismes physiopathologiques participant au développement d'une insulino-résistance lipotoxique sous agonistes PPAR- $\delta$  sont encore imparfaitement compris à ce jour. En effet, ils ne semblent pas toucher les acteurs classiquement décrits dans l'insulino-résistance induite par les AG (inhibition de la voie IRS-PI3K par les céramides, diacylglycérol) (Cresser, et coll., 2010) mais pourraient dériver de produits de dégradations des AG issus d'une  $\beta$ -oxydation incomplète (Koves, et coll., 2008). ***Administrés isolément, les agonistes PPAR- $\delta$  pourraient ainsi accroître la susceptibilité à un régime riche en graisses en aggravant la lipotoxicité***

## 2. La pratique de l'exercice endurant

Les effets bénéfiques de l'exercice endurant sur le syndrome métabolique (Albu, et coll., 2010) sont maintenant bien établis, tant pour la normalisation du bilan lipidique (Kelley and Kelley, 2006, Kelley and Kelley, 2007), que pour l'amélioration de l'insulino-sensibilité périphérique (Goodpaster, et coll., 2003) par diminution de la stéatose hépatique et des IMTG (Toledo, et coll., 2007) ainsi que de la diminution de la masse grasse viscérale.

Par ailleurs, il est également bien établi que l'exercice physique est un puissant stimulateur de la biogenèse mitochondriale dans les muscles sollicités par la contraction musculaire (Holloszy, et coll., 1970, Zoll, et coll., 2002). Il a également été montré un effet propre de l'entraînement sur la  $\beta$ -oxydation intra-mitochondriale, effet que nous avons retrouvé dans l'étude à travers l'augmentation de l'activité 3-HAD, dans des proportions même plus importantes que l'activité CS. Cependant, nous avons été surpris de ne pas retrouver cet effet bénéfique lors de l'étude fonctionnelle de l'oxydation des AGLC, nous faisant évoquer l'existence d'un frein relatif au transport des AGLC après adaptation à l'entraînement.

Compte tenu de ce que nous avons dit ci-dessus, on peut se demander si ce frein relatif à l'entrée des AGLC ne participe pas aux effets bénéfiques de l'entraînement sur le syndrome métabolique. En effet, la réponse mitochondriale à l'entraînement limitant toujours le flux en AGLC comparativement aux capacités oxydatives du cycle de Krebs est peut-être un moyen de régulation physiologique pour éviter une oxydation incomplète de ces AG. Le sous-dimensionnement du transport des AGLC par rapport aux capacités de  $\beta$ -oxydation intra-mitochondriale et d'oxydation du cycle de Krebs pourrait constituer une sécurité naturelle. On

notera d'ailleurs que dans le myocarde, dont le métabolisme est pourtant essentiellement lipidique, ce sous-dimensionnement est encore plus important (rapport  $V_{max}$  PC ou PCoA/HAD très faible) mais est peut-être le garant de l'absence de développement d'une lipotoxicité dans ce tissu, exposé en permanence à de fortes concentrations d'AG.

Ceci n'exclut pas pour autant que ce frein puisse être péjoratif pour la réalisation d'une performance en endurance de longue durée.

### 3. L'association d'agoniste PPAR- $\delta$ à l'exercice endurant

Une des premières études utilisant une surexpression du facteur PPAR- $\delta$  n'avait retrouvé un phénotype musculaire particulier que lorsque l'entraînement aérobie avait été proposé aux souris (Luquet, et coll., 2003). Par contre, le modèle d'Evans, qui utilise des souris VP-16 qui sur-expriment une forme constitutionnellement active de PPAR- $\delta$ , présente ce phénotype y compris lorsque les souris sont sédentaires (Wang, et coll., 2004). Ceci suggère donc que la surexpression de PPAR- $\delta$  n'est pas un élément suffisant au phénotype et que l'activation conjointe de ce facteur de transcription est indispensable. L'exercice endurant apparaît ici comme un moyen d'activation parmi d'autres (élévation d'AGL, augmentation du cofacteur PGC-1 $\alpha$ ) et qui présente, outre l'avantage d'être par lui-même bénéfique sur le syndrome métabolique, la capacité d'induire une biogenèse mitochondriale importante.

Outre la sagesse humaine et économique qui enseigne d'avoir d'abord recours à des moyens naturels plutôt que pharmacologiques coûteux et parfois peu sûrs, il apparaît indispensable, en tant que médecin, de conditionner toute prescription thérapeutique par un agoniste PPAR- $\delta$  à une promotion suivie et contrôlée de l'activité physique.

Une telle prescription ne se conçoit que dans une prise en charge globale et sous surveillance, au risque d'aggraver insidieusement les conséquences du tableau métabolique. Une telle prise en charge doit être en mesure de vérifier la réalisation effective d'un exercice physique, qui ne peut être laissée au bon vouloir d'un patient ambulatoire. A notre avis, ceci ne peut s'inscrire que dans le cadre d'un engagement mutuel écrit exposant les bénéfices et risques ou mieux dans le cadre d'une intervention cadrée au sein d'un séjour pluridisciplinaire permettant de faciliter l'apprentissage d'un nouveau mode de vie en renforçant l'adhésion du patient aux stratégies nutritionnelles et sportives proposées.

#### 4. Quelle place pour l'hypoxie ?

Et si ce stage de « remise en forme » se déroulait en altitude ? Question quelque peu provocatrice mais qui mérite d'être posée. Même si des données *in vitro* de la littérature retrouvent un effet délétère de l'hypoxie sur l'expression de PPAR- $\delta$  (Regnault, et coll., 2010), les résultats de l'étude 2 montrent clairement une induction de PPAR- $\delta$  précoce lors d'une exposition à l'hypoxie. Par contre, la possible altération des capacités oxydatives globales, lors de l'exposition chronique à l'hypoxie, doivent faire envisager cette possibilité avec beaucoup de précautions. La limitation de la durée d'exposition semble le principe le plus simple pour limiter les effets délétères sur la biogenèse mitochondriale, alors qu'au contraire, les effets stimulateurs sur PPAR- $\delta$  sont fugaces. De plus, l'association de l'exposition à l'hypoxie à une restriction calorique modérée et la pratique d'un exercice endurant pourrait préserver les capacités oxydatives globales.

#### 5. Association des agonistes PPAR- $\delta$ à d'autres molécules

##### 5.1 Activateur de l'AMPK

Même si la sagesse voudrait que l'on recoure déjà à tous les moyens non pharmacologiques pour la prise en charge efficace et durable d'un tableau métabolique, des associations pharmacologiques ont pu être proposées, dont notamment l'association d'un agoniste PPAR- $\delta$  à un activateur de l'AMPK, l'AICAR. Outre les résultats spectaculaires sur la performance en endurance des animaux ainsi traités, il a été montré qu'un certain nombre de gènes n'étaient induits que par l'association de ces deux molécules, qui génèrent donc un profil transcriptionnel singulier (Narkar, et coll., 2008). De plus, l'AMPK est susceptible de phosphoryler PGC-1 $\alpha$  et ainsi d'augmenter son efficacité transcriptionnelle (Jager, et coll., 2007). Ainsi l'association AMPK/PPAR- $\delta$ /PGC-1 $\alpha$  pourrait permettre un métabolisme lipidique particulièrement efficace. Le faible niveau d'activité de l'AMPK chez les patients insulino-résistants (Viollet, et coll., 2009) et les concentrations élevées en Malonyl-CoA retrouvées chez les diabétiques justifient particulièrement une telle association thérapeutique en clinique pour éviter l'aggravation d'une lipotoxicité.

En pratique, une association avec la metformine, activateur de l'AMPK dans le muscle, peu coûteux, qui bénéficie déjà d'un recul suffisant d'utilisation et reste le traitement de première intention dans le diabète de type 2, pourrait être envisagée.

## 5.2 Activateur des sirtuines

Dès 2006, des recherches se sont intéressées à un polyphénol un peu particulier, le resveratrol présent dans le tanin de vin rouge, activateur des sirtuines, déacétylases NAD<sup>+</sup> dépendantes, qui augmentent l'efficacité transcriptionnelle de PGC-1 $\alpha$  et favorisent ainsi la biogenèse mitochondriale. Ainsi, une amélioration des capacités d'endurance au cours du traitement avait pu être montrée (Lagouge, et coll., 2006). De plus, outre l'effet activateur des sirtuines, le resveratrol est aussi inducteur de l'AMPK. L'association d'un agoniste PPAR- $\delta$  au resveratrol pourrait ainsi créer une synergie intéressante entre d'une part les capacités de transport des AG et d'autre part les capacités oxydatives intra-mitochondriales. D'ailleurs, très récemment, une telle potentialisation permettant une activation conjointe PPAR- $\delta$ /PGC-1 $\alpha$  a été montrée, avec une association resveratrol/agoniste PPAR- $\delta$  (Regnault, et coll., 2010). Dans cette même étude, une glitazone, agoniste PPAR- $\gamma$  possède aussi un effet activateur sur Sirt-1, ce qui pourrait faire de cette molécule un autre candidat potentiel pour l'association, d'autant que les glitazones représentent une alternative de traitement des diabètes de type 2 mal équilibrés.

**CONCLUSION et PERSPECTIVES**

Alors que la tissu spécificité (Veksler, et coll., 1995), et la plasticité du système de transfert de l'énergie (Tonkonogi, et coll., 1998, Zoll, et coll., 2003) ont été largement étudiées et que les particularités du système de la créatine kinase mitochondriale sont maintenant bien connues, nous avons réalisé là les premières études traitant de la plasticité mitochondriale de l'utilisation de différents substrats, caractérisée préalablement par Ponsot (Ponsot, et coll., 2005).

Nos résultats suggèrent d'une part qu'une telle plasticité mitochondriale existe et qu'elle pourrait participer à la flexibilité métabolique observée dans certaines situations, d'autre part que le transport des acides gras à longues chaînes est une étape limitante de l'utilisation des AG après adaptation à l'entraînement.

Les différentes situations modulatrices de l'utilisation préférentielle des substrats utilisées dans notre travail l'illustrent.

Ainsi, en **restriction calorique**, nous montrons dans le soléaire une diminution de l'oxydation maximale en pyruvate qui a pu être mise en relation avec une inhibition de la pyruvate-déshydrogénase, et par ailleurs une induction d'UCP-3. Dans cette situation, l'origine de la facilitation du métabolisme des AG pourrait être le frein à l'oxydation du pyruvate. L'inactivation de la PDH, associée à l'induction d'UCP-3, diminuerait l'oxydation du pyruvate qui serait compensée par l'augmentation de l'oxydation du palmitoyl-carnitine.

Outre ce phénomène compensatoire, il semble exister en **hypoxie** une véritable facilitation intrinsèque pour l'oxydation du palmitoyl-carnitine. En effet l'augmentation d'affinité pour le palmitoyl-carnitine existe en l'absence de diminution de l'affinité pour le pyruvate. Cependant devant la mise en évidence d'un frein en amont sur l'étape de transport CPT-1 du palmitoyl-carnitine, cette augmentation d'affinité pourrait aussi n'être que de nature compensatoire.

Enfin, la situation de **traitement par un agoniste PPAR- $\delta$**  combine certainement les deux facteurs. En effet, le GW 742 permet de diminuer l'oxydation du pyruvate, ce qui participe certainement à la facilitation observée de l'oxydation des AGLC. Cette facilitation du flux sous-maximal pourrait favoriser le glissement métabolique des glucides vers les lipides ou alors l'altération de l'oxydation du pyruvate faciliterait l'utilisation des AG. De plus, le GW 742 augmente les capacités de transport maximal pour les AGLC, tant à l'étape CPT-1 qu'en aval. La régulation conjointe et coordonnée de ces deux voies qualitative et quantitative, du

flux sous-maximal et maximal en AG, permet certainement d'optimiser au mieux l'oxydation des AGLC.

Quant à l'**entraînement aérobie**, contrairement à notre hypothèse initiale, il n'est pas capable de faciliter l'oxydation du palmitoyl-CoA. Alors que les capacités de  $\beta$ -oxydation intra-mitochondriale sont augmentées, nous avons mis en évidence un frein sur les deux étapes du transport mitochondrial des AGLC au niveau de CPT-1 et en aval.

Ces expérimentations sont les premières à proposer une approche fonctionnelle de l'activité CPT-1, par étude comparative des cinétiques d'oxydation du palmitoyl-CoA et du palmitoyl-carnitine. Outre le fait que le palmitoyl-CoA est le substrat immédiatement dérivé du palmitate, acide gras à longue chaîne le plus représenté dans l'organisme, cette approche fonctionnelle peut être de grand intérêt pour l'étude des myopathies mitochondriales acquises. En effet, si l'application de la technique décrite par Ponsot avec le palmitoyl-carnitine a été utilisée chez l'homme par l'équipe de Mazat pour le dépistage de certains déficits congénitaux en CPT-2 (Mazat, et coll., 1997), l'arrivée des techniques de biologie moléculaire permettant le dépistage génétique de ces maladies l'a quelque peu reléguée en second plan. Au contraire de CPT-2, il n'a pour l'instant jamais été décrit de pathologie congénitale portant sur la forme musculaire de CPT-1, ce qui n'exclut cependant pas des dysfonctions acquises de ce système enzymatique qui pourraient être étudiées par ce type de protocole en utilisant du palmitoyl-CoA.

*Perspective. Compte tenu des adaptations suggérées dans cette étude, notamment à l'hypoxie et à la restriction calorique, l'étude du déconditionnement musculaire des patients porteurs de pathologies chroniques telles que broncho-pneumopathie obstructive (BPCO) pourraient aussi bénéficier de telles explorations pour mieux caractériser la part liée à l'hypoxie, à la dénutrition et à l'hypoactivité dans le développement de la myopathie métabolique décrite dans la BPCO. Enfin, elles pourraient aussi objectiver les bénéfices métaboliques de différentes modalités de réentraînement proposées notamment le renforcement musculaire, plus facile à mettre en place, mieux toléré et ayant donc une meilleure observance qu'un classique réentraînement aérobie exclusif, et ceci non seulement pour les patients BPCO mais pour tous ceux porteurs de maladies chroniques ayant des conséquences musculaires (insuffisance cardiaque, diabète de type 2).*

Ces résultats soulèvent d'autres questions mécanistiques visant à comprendre la mise en place de telles adaptations et des supports moléculaires sur lesquels pourrait reposer cette plasticité intrinsèque de la mitochondrie. Compte tenu du rôle récemment montré de l'hexokinase non seulement sur la régulation du flux glycolytique mais aussi sur sa capacité à hyperpolariser la membrane mitochondriale en se liant au VDAC, l'hexokinase pourrait ainsi participer à l'orientation du type de substrat oxydé. Or plusieurs facteurs sont connus pour moduler l'activité de l'hexokinase. Outre son inhibition par le glucose-6P, la protéine GSK-3, modulée à l'exercice ainsi qu'HIF-1 (Lambert, et coll., 2010) sont capables d'entraîner sa translocation à la membrane mitochondriale.

*Perspective. Comme le substrat de l'hexokinase est l'ATP, il est envisageable d'étudier sa fonctionnalité in situ en ajoutant des concentrations croissantes d'ATP dans la chambre d'oxygraphie et de réaliser une véritable cinétique d'activation comme on le fait avec l'ADP pour le système des créatine-kinases mitochondriales dans les muscles oxydatifs.*

Au cours de l'étude n°3, nous avons pu constater un effet du GW 742 sur la réponse hypertrophique du cœur. Ainsi, sur les données morphométriques, il existe une hypertrophie du ventricule gauche en réponse à l'entraînement plus marquée dans le groupe traité au GW 742. De façon comparable pour le ventricule droit, la réponse hypertrophique à l'hypoxie est renforcée chez les animaux traités. Cette observation d'un effet hypertrophiant du GW 742 avait déjà été faite par l'équipe de Grimaldi (Wagner, et coll., 2009).

*Perspective. A terme, nous voudrions préciser le rôle du GW 742 dans deux modèles d'hypertrophie cardiaque que sont l'exercice répété (HVG) et l'hypoxie chronique (HVD). Le premier agit essentiellement par une augmentation de la précharge et de la contractilité ; le second correspond à une réponse adaptative à l'augmentation de la postcharge liée au développement de l'HTAP hypoxique.*

Wagner suggère une action hypertrophiante du GW 742 médiée par l'activation de la calcineurine (Wagner, et coll., 2009). Or, notre équipe a montré d'une part le rôle de l'hypoxie dans l'activation de la voie calcineurine, d'autre part l'inhibition de l'activation de la voie HIF-1 par l'inhibition de l'activité de la calcineurine (Koulmann, et coll., 2006).

*Perspective. Il paraît donc particulièrement intéressant d'étudier l'interaction entre ces voies, en présence ou en l'absence de GW 742 et leur retentissement sur l'hypertrophie cardiaque.*

Enfin, une autre question d'intérêt est celle des relations entre modulations du métabolisme énergétique, hypertrophie et fonction cardiaque, sujet qui fait actuellement débat (Krishnan, et coll., 2009, Piao, et coll., 2010, van Bilsen, et coll., 2009).

*Perspective. Nous pourrions étudier le retentissement des modifications métaboliques induites par le GW 742 sur la contractilité cardiaque en lien avec la réponse hypertrophique.*

Enfin, le rôle trophique des agonistes PPAR- $\delta$  sur le muscle squelettique reste encore à explorer. Même si nous n'avons ici observé aucun effet particulier du GW 742 sur la masse des muscles squelettiques, nous n'étions pas dans un contexte de modulation majeure de la masse musculaire. Or, plusieurs travaux contradictoires laissent à penser que le GW 742 pourrait interagir avec la voie du contrôle de la masse musculaire. Ainsi l'équipe de Grimaldi a montré une hypertrophie des muscles squelettiques après seulement quatre jours de traitement, ce qui est un résultat pour le moins interpellant (Gaudel, et coll., 2008). Au contraire, FoxO-1, facteur contrôlant la voie des atrogènes, a clairement été identifié comme étant une cible de PPAR- $\delta$  (Nahle, et coll., 2008), alors qu'une augmentation de Murf-1 et MaFbx, deux atrogènes bien connus, est observée après huit jours de traitement par GW 742 (Constantin, et coll., 2007). Aussi tout ceci mérite d'être précisé.

*Perspective. Nous proposons donc l'étude du rôle de PPAR- $\delta$  dans la situation caricaturale d'hypertrophie musculaire liée à la surcharge fonctionnelle par ablation des agonistes, de façon à mettre en évidence un éventuel frein lié à l'activation des atrogènes par l'agoniste GW 742.*

**BIBLIOGRAPHIE**

1. **Abdelmalki A, Fimbel S, Mayet-Sornay MH, Sempore B, and Favier R.** Aerobic capacity and skeletal muscle properties of normoxic and hypoxic rats in response to training. *Pflugers Arch* 431: 671-679, 1996.
2. **Acin-Perez R, Fernandez-Silva P, Peleato ML, Perez-Martos A, and Enriquez JA.** Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 32: 529-539, 2008.
3. **Akimoto T, Pohnert SC, Li P, Zhang M, Gumbs C, Rosenberg PB, Williams RS, and Yan Z.** Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J Biol Chem* 280: 19587-19593, 2005.
4. **Akimoto T, Ribar TJ, Williams RS, and Yan Z.** Skeletal muscle adaptation in response to voluntary running in Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV-deficient mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C1311-1319, 2004.
5. **Alam N, and Saggerson ED.** Malonyl-CoA and the regulation of fatty acid oxidation in soleus muscle. *Biochem J* 334 ( Pt 1): 233-241, 1998.
6. **Albu JB, Heilbronn LK, Kelley DE, Smith SR, Azuma K, Berk ES, Pi-Sunyer FX, and Ravussin E.** Metabolic changes following a 1-year diet and exercise intervention in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 59: 627-633, 2010.
7. **Aragones J, Schneider M, Van Geyte K, Fraisl P, Dresselaers T, Mazzone M, Dirx R, Zacchigna S, Lemieux H, Jeoung NH, Lambrechts D, Bishop T, Lafuste P, Diez-Juan A, Harten SK, Van Noten P, De Bock K, Willam C, Tjwa M, Grosfeld A, Navet R, Moons L, Vandendriessche T, Deroose C, Wijeyekoon B, Nuyts J, Jordan B, Silasi-Mansat R, Lupu F, Dewerschin M, Pugh C, Salmon P, Mortelmans L, Gallez B, Gorus F, Buyse J, Sluse F, Harris RA, Gnaiger E, Hespel P, Van Hecke P, Schuit F, Van Veldhoven P, Ratcliffe P, Baes M, Maxwell P, and Carmeliet P.** Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat Genet* 40: 170-180, 2008.
8. **Arany Z, Foo SY, Ma Y, Ruas JL, Bommi-Reddy A, Girnun G, Cooper M, Laznik D, Chinsomboon J, Rangwala SM, Baek KH, Rosenzweig A, and Spiegelman BM.** HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *Nature* 451: 1008-1012, 2008.
9. **Bakkman L, Sahlin K, Holmberg HC, and Tonkonogi M.** Quantitative and qualitative adaptation of human skeletal muscle mitochondria to hypoxic compared with normoxic training at the same relative work rate. *Acta Physiol (Oxf)* 190: 243-251, 2007.
10. **Baldwin KM, and Haddad F.** Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil* 81: S40-51, 2002.
11. **Baldwin KM, Klinkerfuss GH, Terjung RL, Mole PA, and Holloszy JO.** Respiratory capacity of white, red, and intermediate muscle: adaptative response to exercise. *Am J Physiol* 222: 373-378, 1972.
12. **Banzet S, Koulmann N, Sanchez H, Serrurier B, Peinnequin A, and Bigard AX.** Musclin gene expression is strongly related to fast-glycolytic phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 353: 713-718, 2007.
13. **Barak Y, and Kim S.** Genetic manipulations of PPARs: effects on obesity and metabolic disease. *PPAR Res* 2007: 12781, 2007.
14. **Barnholt KE, Hoffman AR, Rock PB, Muza SR, Fulco CS, Braun B, Holloway L, Mazzeo RS, Cymerman A, and Friedlander AL.** Endocrine responses to acute and chronic high-altitude exposure (4,300 meters): modulating effects of caloric restriction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E1078-1088, 2006.
15. **Barrero MJ, Camarero N, Marrero PF, and Haro D.** Control of human carnitine palmitoyltransferase II gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor through a partially conserved peroxisome proliferator-responsive element. *Biochem J* 369: 721-729, 2003.
16. **Barthel A, Schmoll D, and Unterman TG.** FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 16: 183-189, 2005.
17. **Bastie CC, Nahle Z, McLoughlin T, Esser K, Zhang W, Unterman T, and Abumrad NA.** FoxO1 stimulates fatty acid uptake and oxidation in muscle cells through CD36-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 280: 14222-14229, 2005.
18. **Bastin J, Aubey F, Rotig A, Munnich A, and Djouadi F.** Activation of peroxisome proliferator-activated receptor pathway stimulates the mitochondrial respiratory chain and can correct deficiencies in patients' cells lacking its components. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 1433-1441, 2008.
19. **Bedu E, Desplanches D, Pequignot J, Bordier B, and Desvergne B.** Double gene deletion reveals the lack of cooperation between PPARalpha and PPARbeta in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 357: 877-881, 2007.
20. **Belanger AJ, Luo Z, Vincent KA, Akita GY, Cheng SH, Gregory RJ, and Jiang C.** Hypoxia-inducible factor 1 mediates hypoxia-induced cardiomyocyte lipid accumulation by reducing the DNA binding

- activity of peroxisome proliferator-activated receptor alpha/retinoid X receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 364: 567-572, 2007.
21. **Benton CR, Holloway GP, Campbell SE, Yoshida Y, Tandon NN, Glatz JF, Luiken JJ, Spriet LL, and Bonen A.** Rosiglitazone increases fatty acid oxidation and fatty acid translocase (FAT/CD36) but not carnitine palmitoyltransferase I in rat muscle mitochondria. *J Physiol* 586: 1755-1766, 2008.
  22. **Benton CR, Koonen DP, Calles-Escandon J, Tandon NN, Glatz JF, Luiken JJ, Heikkila JJ, and Bonen A.** Differential effects of contraction and PPAR agonists on the expression of fatty acid transporters in rat skeletal muscle. *J Physiol* 573: 199-210, 2006.
  23. **Benton CR, Nickerson JG, Lally J, Han XX, Holloway GP, Glatz JF, Luiken JJ, Graham TE, Heikkila JJ, and Bonen A.** Modest PGC-1alpha overexpression in muscle in vivo is sufficient to increase insulin sensitivity and palmitate oxidation in subsarcolemmal, not intermyofibrillar, mitochondria. *J Biol Chem* 283: 4228-4240, 2008.
  24. **Berthon PM, Howlett RA, Heigenhauser GJ, and Spriet LL.** Human skeletal muscle carnitine palmitoyltransferase I activity determined in isolated intact mitochondria. *J Appl Physiol* 85: 148-153, 1998.
  25. **Bevilacqua L, Ramsey JJ, Hagopian K, Weindruch R, and Harper ME.** Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E852-861, 2004.
  26. **Bezaire V, Bruce CR, Heigenhauser GJ, Tandon NN, Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A, and Spriet LL.** Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E509-515, 2006.
  27. **Bezaire V, Seifert EL, and Harper ME.** Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery. *FASEB J* 21: 312-324, 2007.
  28. **Bigard AX, Brunet A, Guezennec CY, and Monod H.** Skeletal muscle changes after endurance training at high altitude. *J Appl Physiol* 71: 2114-2121, 1991.
  29. **Bigard AX, Sanchez H, Birot O, and Serrurier B.** Myosin heavy chain composition of skeletal muscles in young rats growing under hypobaric hypoxia conditions. *J Appl Physiol* 88: 479-486, 2000.
  30. **Birot OJ, Koulmann N, Peinnequin A, and Bigard XA.** Exercise-induced expression of vascular endothelial growth factor mRNA in rat skeletal muscle is dependent on fibre type. *J Physiol* 552: 213-221, 2003.
  31. **Bissonnette DJ, and Jeejeebhoy KN.** Feeding a low energy diet and refeeding a control diet affect glycolysis differently in the slow- and fast-twitch muscles of adult male Wistar rats. *J Nutr* 128: 1723-1730, 1998.
  32. **Bo H, Wang YH, Li HY, Zhao J, Zhang HY, and Tong CQ.** Endurance training attenuates the bioenergetics alterations of rat skeletal muscle mitochondria submitted to acute hypoxia: Role of ROS and UCP3. *Sheng Li Xue Bao* 60: 767-776, 2008.
  33. **Boekema EJ, and Braun HP.** Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem* 282: 1-4, 2007.
  34. **Bonen A, Campbell SE, Benton CR, Chabowski A, Coort SL, Han XX, Koonen DP, Glatz JF, and Luiken JJ.** Regulation of fatty acid transport by fatty acid translocase/CD36. *Proc Nutr Soc* 63: 245-249, 2004.
  35. **Bonen A, Chabowski A, Luiken JJ, and Glatz JF.** Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? Mechanisms and regulation of protein-mediated cellular fatty acid uptake: molecular, biochemical, and physiological evidence. *Physiology (Bethesda)* 22: 15-29, 2007.
  36. **Bonen A, Dyck DJ, Ibrahimi A, and Abumrad NA.** Muscle contractile activity increases fatty acid metabolism and transport and FAT/CD36. *Am J Physiol* 276: E642-649, 1999.
  37. **Bonen A, Luiken JJ, and Glatz JF.** Regulation of fatty acid transport and membrane transporters in health and disease. *Mol Cell Biochem* 239: 181-192, 2002.
  38. **Bonen A, Luiken JJ, Liu S, Dyck DJ, Kiens B, Kristiansen S, Turcotte LP, Van Der Vusse GJ, and Glatz JF.** Palmitate transport and fatty acid transporters in red and white muscles. *Am J Physiol* 275: E471-478, 1998.
  39. **Bonnefont JP, Bastin J, Behin A, and Djouadi F.** Bezafibrate for an inborn mitochondrial beta-oxidation defect. *N Engl J Med* 360: 838-840, 2009.
  40. **Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A, and Bastin J.** Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med* 25: 495-520, 2004.
  41. **Bonnet S, Rochefort G, Sutendra G, Archer SL, Haromy A, Webster L, Hashimoto K, Bonnet SN, and Michelakis ED.** The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 11418-11423, 2007.
  42. **Bouillaud F.** UCP2, not a physiologically relevant uncoupler but a glucose sparing switch impacting ROS production and glucose sensing. *Biochim Biophys Acta* 1787: 377-383, 2009.

43. **Bourdillon N, Mollard P, Letournel M, Beaudry M, and Richalet JP.** Non-invasive evaluation of the capillary recruitment in the human muscle during exercise in hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 165: 237-244, 2009.
44. **Brahimi-Horn MC, and Pouyssegur J.** HIF at a glance. *J Cell Sci* 122: 1055-1057, 2009.
45. **Braun B, Mawson JT, Muza SR, Dominick SB, Brooks GA, Horning MA, Rock PB, Moore LG, Mazzeo RS, Ezeji-Okoye SC, and Butterfield GE.** Women at altitude: carbohydrate utilization during exercise at 4,300 m. *J Appl Physiol* 88: 246-256, 2000.
46. **Brdiczka D.** Contact sites between mitochondrial envelope membranes. Structure and function in energy- and protein-transfer. *Biochim Biophys Acta* 1071: 291-312, 1991.
47. **Brdiczka D, Kaldis P, and Wallimann T.** In vitro complex formation between the octamer of mitochondrial creatine kinase and porin. *J Biol Chem* 269: 27640-27644, 1994.
48. **Brooks GA, Butterfield GE, Wolfe RR, Groves BM, Mazzeo RS, Sutton JR, Wolfel EE, and Reeves JT.** Increased dependence on blood glucose after acclimatization to 4,300 m. *J Appl Physiol* 70: 919-927, 1991.
49. **Brooks GA, and Mercier J.** Balance of carbohydrate and lipid utilization during exercise: the "crossover" concept. *J Appl Physiol* 76: 2253-2261, 1994.
50. **Brugarolas J, and Kaelin WG, Jr.** Dysregulation of HIF and VEGF is a unifying feature of the familial hamartoma syndromes. *Cancer Cell* 6: 7-10, 2004.
51. **Brunmair B, Lest A, Staniek K, Gras F, Scharf N, Roden M, Nohl H, Waldhausl W, and Fornsinn C.** Fenofibrate impairs rat mitochondrial function by inhibition of respiratory complex I. *J Pharmacol Exp Ther* 311: 109-114, 2004.
52. **Burelle Y, and Hochachka PW.** Endurance training induces muscle-specific changes in mitochondrial function in skinned muscle fibers. *J Appl Physiol* 92: 2429-2438, 2002.
53. **Burns KA, and Vanden Heuvel JP.** Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1771: 952-960, 2007.
54. **Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, and Wittwer CT.** The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611-622, 2009.
55. **Campbell FM, Kozak R, Wagner A, Altarejos JY, Dyck JR, Belke DD, Severson DL, Kelly DP, and Lopaschuk GD.** A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the control of cardiac malonyl-CoA levels: reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPARalpha are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase. *J Biol Chem* 277: 4098-4103, 2002.
56. **Campbell SE, Tandon NN, Woldegiorgis G, Luiken JJ, Glatz JF, and Bonen A.** A novel function for fatty acid translocase (FAT)/CD36: involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria. *J Biol Chem* 279: 36235-36241, 2004.
57. **Ceddia RB.** Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implications for glucose and fatty acids homeostasis. *Int J Obes (Lond)* 29: 1175-1183, 2005.
58. **Cerretelli P, and Gelfi C.** Energy metabolism in hypoxia: reinterpreting some features of muscle physiology on molecular grounds. *Eur J Appl Physiol* 2010.
59. **Chabowski A, Chatham JC, Tandon NN, Calles-Escandon J, Glatz JF, Luiken JJ, and Bonen A.** Fatty acid transport and FAT/CD36 are increased in red but not in white skeletal muscle of ZDF rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E675-682, 2006.
60. **Chabowski A, Coort SL, Calles-Escandon J, Tandon NN, Glatz JF, Luiken JJ, and Bonen A.** The subcellular compartmentation of fatty acid transporters is regulated differently by insulin and by AICAR. *FEBS Lett* 579: 2428-2432, 2005.
61. **Chabowski A, Gorski J, Calles-Escandon J, Tandon NN, and Bonen A.** Hypoxia-induced fatty acid transporter translocation increases fatty acid transport and contributes to lipid accumulation in the heart. *FEBS Lett* 580: 3617-3623, 2006.
62. **Chinsomboon J, Ruas J, Gupta RK, Thom R, Shoag J, Rowe GC, Sawada N, Raghuram S, and Arany Z.** The transcriptional coactivator PGC-1alpha mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21401-21406, 2009.
63. **Chokkalingam K, Jewell K, Norton L, Littlewood J, van Loon LJ, Mansell P, Macdonald IA, and Tsintzas K.** High-fat/low-carbohydrate diet reduces insulin-stimulated carbohydrate oxidation but stimulates nonoxidative glucose disposal in humans: An important role for skeletal muscle pyruvate dehydrogenase kinase 4. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 284-292, 2007.

64. **Chomczynski P, and Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987.
65. **Cluberton LJ, McGee SL, Murphy RM, and Hargreaves M.** Effect of carbohydrate ingestion on exercise-induced alterations in metabolic gene expression. *J Appl Physiol* 99: 1359-1363, 2005.
66. **Coggan AR, Raguso CA, Gastaldelli A, Sidossis LS, and Yeckel CW.** Fat metabolism during high-intensity exercise in endurance-trained and untrained men. *Metabolism* 49: 122-128, 2000.
67. **Constantin-Teodosiu D, Baker DJ, Constantin D, and Greenhaff PL.** PPARdelta agonism inhibits skeletal muscle PDC activity, mitochondrial ATP production and force generation during prolonged contraction. *J Physiol* 587: 231-239, 2009.
68. **Constantin D, Constantin-Teodosiu D, Layfield R, Tsintzas K, Bennett AJ, and Greenhaff PL.** PPARdelta agonism induces a change in fuel metabolism and activation of an atrophy programme, but does not impair mitochondrial function in rat skeletal muscle. *J Physiol* 583: 381-390, 2007.
69. **Coyle EF, Jeukendrup AE, Wagenmakers AJ, and Saris WH.** Fatty acid oxidation is directly regulated by carbohydrate metabolism during exercise. *Am J Physiol* 273: E268-275, 1997.
70. **Cresser J, Bonen A, Chabowski A, Stefanyk LE, Gulli R, Ritchie I, and Dyck DJ.** Oral administration of a PPAR-delta agonist to rodents worsens, not improves, maximal insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle of different fibers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299: R470-479, 2010.
71. **Criscuolo F, Mozo J, Hurtaud C, Nubel T, and Bouillaud F.** UCP2, UCP3, avUCP, what do they do when proton transport is not stimulated? Possible relevance to pyruvate and glutamine metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1757: 1284-1291, 2006.
72. **Crossno JT, Jr., Garat CV, Reusch JE, Morris KG, Dempsey EC, McMurtry IF, Stenmark KR, and Klemm DJ.** Rosiglitazone attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L885-897, 2007.
73. **Daneshrad Z.** Distinction des effets du stimulus hypoxie et de ceux de la restriction alimentaire sur le métabolisme énergétique myocardique chez le rat soumis à une hypoxie chronique. Grenoble: Université Joseph Fourier, 1999, p. 196.
74. **Dang CV, and Gao P.** Muscle fatigue from losing your PHD. *Cell Metab* 7: 191-192, 2008.
75. **Dapp C, Gassmann M, Hoppeler H, and Fluck M.** Hypoxia-induced gene activity in disused oxidative muscle. *Adv Exp Med Biol* 588: 171-188, 2006.
76. **Daussin FN, Zoll J, Ponsot E, Dufour SP, Doutreleau S, Lonsdorfer E, Ventura-Clapier R, Mettauer B, Piquard F, Geny B, and Richard R.** Training at high exercise intensity promotes qualitative adaptations of mitochondrial function in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 104: 1436-1441, 2008.
77. **de Lange P, Farina P, Moreno M, Ragni M, Lombardi A, Silvestri E, Burrone L, Lanni A, and Goglia F.** Sequential changes in the signal transduction responses of skeletal muscle following food deprivation. *FASEB J* 20: 2579-2581, 2006.
78. **de Lange P, Moreno M, Silvestri E, Lombardi A, Goglia F, and Lanni A.** Fuel economy in food-deprived skeletal muscle: signaling pathways and regulatory mechanisms. *FASEB J* 21: 3431-3441, 2007.
79. **de Lange P, Ragni M, Silvestri E, Moreno M, Schiavo L, Lombardi A, Farina P, Feola A, Goglia F, and Lanni A.** Combined cDNA array/RT-PCR analysis of gene expression profile in rat gastrocnemius muscle: relation to its adaptive function in energy metabolism during fasting. *FASEB J* 18: 350-352, 2004.
80. **De Palma S, Ripamonti M, Vigano A, Moriggi M, Capitanio D, Samaja M, Milano G, Cerretelli P, Wait R, and Gelfi C.** Metabolic modulation induced by chronic hypoxia in rats using a comparative proteomic analysis of skeletal muscle tissue. *J Proteome Res* 6: 1974-1984, 2007.
81. **de Paula P, and Niebauer J.** Effects of high altitude training on exercise capacity: fact or myth. *Sleep Breath* 2010.
82. **Dean D, Daugaard JR, Young ME, Saha A, Vavvas D, Asp S, Kiens B, Kim KH, Witters L, Richter EA, and Ruderman N.** Exercise diminishes the activity of acetyl-CoA carboxylase in human muscle. *Diabetes* 49: 1295-1300, 2000.
83. **Defaux A, Zurich MG, Braissant O, Honegger P, and Monnet-Tschudi F.** Effects of the PPAR-beta agonist GW501516 in an in vitro model of brain inflammation and antibody-induced demyelination. *J Neuroinflammation* 6: 15, 2009.
84. **Degenhardt T, Saramaki A, Malinen M, Rieck M, Vaisanen S, Huotari A, Herzig KH, Muller R, and Carlberg C.** Three members of the human pyruvate dehydrogenase kinase gene family are direct targets of the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J Mol Biol* 372: 341-355, 2007.
85. **Delarue J, and Magnan C.** Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10: 142-148, 2007.

86. **Desplanches D, Hoppeler H, Linossier MT, Denis C, Claassen H, Dormois D, Lacour JR, and Geysant A.** Effects of training in normoxia and normobaric hypoxia on human muscle ultrastructure. *Pflugers Arch* 425: 263-267, 1993.
87. **Discher DJ, Bishopric NH, Wu X, Peterson CA, and Webster KA.** Hypoxia regulates beta-enolase and pyruvate kinase-M promoters by modulating Sp1/Sp3 binding to a conserved GC element. *J Biol Chem* 273: 26087-26093, 1998.
88. **Djouadi F, Aubey F, Schlemmer D, and Bastin J.** Peroxisome proliferator activated receptor delta (PPARdelta) agonist but not PPARalpha corrects carnitine palmitoyl transferase 2 deficiency in human muscle cells. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 1791-1797, 2005.
89. **Doerge H, and Stahl A.** Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda)* 21: 259-268, 2006.
90. **Dressel U, Allen TL, Pippal JB, Rohde PR, Lau P, and Muscat GE.** The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol* 17: 2477-2493, 2003.
91. **Dzamko N, Schertzer JD, Ryall JG, Steel R, Macaulay SL, Wee S, Chen ZP, Michell BJ, Oakhill JS, Watt MJ, Jorgensen SB, Lynch GS, Kemp BE, and Steinberg GR.** AMPK-independent pathways regulate skeletal muscle fatty acid oxidation. *J Physiol* 586: 5819-5831, 2008.
92. **Ehrenborg E, and Krook A.** Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Pharmacol Rev* 61: 373-393, 2009.
93. **Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, and Desvergne B.** Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology* 142: 4195-4202, 2001.
94. **Evans RL, Hirth G, Baba K, Forsyth D, Chave A, and Mackie R.** Geophysical evidence from the MELT area for compositional controls on oceanic plates. *Nature* 437: 249-252, 2005.
95. **Faiola F, Wu YT, Pan S, Zhang K, Farina A, and Martinez E.** Max is acetylated by p300 at several nuclear localization residues. *Biochem J* 403: 397-407, 2007.
96. **Faye A, Borthwick K, Esnous C, Price NT, Gobin S, Jackson VN, Zammit VA, Girard J, and Prip-Buus C.** Demonstration of N- and C-terminal domain intramolecular interactions in rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 that determine its degree of malonyl-CoA sensitivity. *Biochem J* 387: 67-76, 2005.
97. **Finley LW, and Haigis MC.** The coordination of nuclear and mitochondrial communication during aging and calorie restriction. *Ageing Res Rev* 8: 173-188, 2009.
98. **Flueck M.** Plasticity of the muscle proteome to exercise at altitude. *High Alt Med Biol* 10: 183-193, 2009.
99. **Fraser F, Padovese R, and Zammit VA.** Distinct kinetics of carnitine palmitoyltransferase i in contact sites and outer membranes of rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 276: 20182-20185, 2001.
100. **Fraser F, and Zammit VA.** Enrichment of carnitine palmitoyltransferases I and II in the contact sites of rat liver mitochondria. *Biochem J* 329 ( Pt 2): 225-229, 1998.
101. **Freyssenet D.** Energy sensing and regulation of gene expression in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 102: 529-540, 2007.
102. **Fritz T, Kramer DK, Karlsson HK, Galuska D, Engfeldt P, Zierath JR, and Krook A.** Low-intensity exercise increases skeletal muscle protein expression of PPARdelta and UCP3 in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev* 22: 492-498, 2006.
103. **Fulco CS, Rock PB, and Cymerman A.** Maximal and submaximal exercise performance at altitude. *Aviat Space Environ Med* 69: 793-801, 1998.
104. **Furuyama T, Kitayama K, Yamashita H, and Mori N.** Forkhead transcription factor FOXO1 (FKHR)-dependent induction of PDK4 gene expression in skeletal muscle during energy deprivation. *Biochem J* 375: 365-371, 2003.
105. **Galbes O, Goret L, Caillaud C, Mercier J, Obert P, Candau R, and Py G.** Combined effects of hypoxia and endurance training on lipid metabolism in rat skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)* 193: 163-173, 2008.
106. **Gamboia JL, and Andrade FH.** Mitochondrial content and distribution changes specific to mouse diaphragm after chronic normobaric hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298: R575-583, 2010.
107. **Garcia-Martinez C, Sibille B, Solanes G, Darimont C, Mace K, Villarroya F, and Gomez-Foix AM.** Overexpression of UCP3 in cultured human muscle lowers mitochondrial membrane potential, raises ATP/ADP ratio, and favors fatty acid vs. glucose oxidation. *FASEB J* 15: 2033-2035, 2001.

108. **Garcia-Roves P, Huss JM, Han DH, Hancock CR, Iglesias-Gutierrez E, Chen M, and Holloszy JO.** Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 10709-10713, 2007.
109. **Gaudel C, Schwartz C, Giordano C, Abumrad NA, and Grimaldi PA.** Pharmacological activation of PPARbeta promotes rapid and calcineurin-dependent fiber remodeling and angiogenesis in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E297-304, 2008.
110. **Gnaiger E.** Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respir Physiol* 128: 277-297, 2001.
111. **Gonzalez NC, Clancy RL, and Wagner PD.** Determinants of maximal oxygen uptake in rats acclimated to simulated altitude. *J Appl Physiol* 75: 1608-1614, 1993.
112. **Goodpaster BH, Katsiaras A, and Kelley DE.** Enhanced fat oxidation through physical activity is associated with improvements in insulin sensitivity in obesity. *Diabetes* 52: 2191-2197, 2003.
113. **Grimaldi PA.** Metabolic and nonmetabolic regulatory functions of peroxisome proliferator-activated receptor beta. *Curr Opin Lipidol* 21: 186-191, 2010.
114. **Gulick T, Cresci S, Caira T, Moore DD, and Kelly DP.** The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 11012-11016, 1994.
115. **Gutgesell A, Wen G, Konig B, Koch A, Spielmann J, Stangl GI, Eder K, and Ringseis R.** Mouse carnitine-acylcarnitine translocase (CACT) is transcriptionally regulated by PPARalpha and PPARdelta in liver cells. *Biochim Biophys Acta* 1790: 1206-1216, 2009.
116. **Guzman M, and Castro J.** Effects of endurance exercise on carnitine palmitoyltransferase I from rat heart, skeletal muscle and liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 963: 562-565, 1988.
117. **Hagberg CE, Falkevall A, Wang X, Larsson E, Huusko J, Nilsson I, van Meeteren LA, Samen E, Lu L, Vanwildemeersch M, Klar J, Genove G, Pietras K, Stone-Elander S, Claesson-Welsh L, Yla-Herttuala S, Lindahl P, and Eriksson U.** Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature* 464: 917-921, 2010.
118. **Hancock CR, Han DH, Chen M, Terada S, Yasuda T, Wright DC, and Holloszy JO.** High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7815-7820, 2008.
119. **Handschin C, Rhee J, Lin J, Tarr PT, and Spiegelman BM.** An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7111-7116, 2003.
120. **Hardie DG.** AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 4: S7-12, 2008.
121. **Harrington LS, Moreno L, Reed A, Wort SJ, Desvergne B, Garland C, Zhao L, and Mitchell JA.** The PPARbeta/delta agonist GW0742 relaxes pulmonary vessels and limits right heart hypertrophy in rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *PLoS One* 5: e9526, 2010.
122. **Harrington WW, C SB, J GW, N OM, J GB, D CL, W RO, M CL, and D MI.** The Effect of PPARalpha, PPARdelta, PPARgamma, and PPARpan Agonists on Body Weight, Body Mass, and Serum Lipid Profiles in Diet-Induced Obese AKR/J Mice. *PPAR Res* 2007: 97125, 2007.
123. **Harris RA, Bowker-Kinley MM, Huang B, and Wu P.** Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex. *Adv Enzyme Regul* 42: 249-259, 2002.
124. **Harris RA, Huang B, and Wu P.** Control of pyruvate dehydrogenase kinase gene expression. *Adv Enzyme Regul* 41: 269-288, 2001.
125. **Henriksson J.** Training induced adaptation of skeletal muscle and metabolism during submaximal exercise. *J Physiol* 270: 661-675, 1977.
126. **Hesselink MK, Keizer HA, Borghouts LB, Schaart G, Kornips CF, Slieker LJ, Sloop KW, Saris WH, and Schrauwen P.** Protein expression of UCP3 differs between human type 1, type 2a, and type 2b fibers. *FASEB J* 15: 1071-1073, 2001.
127. **Himms-Hagen J, and Harper ME.** Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 226: 78-84, 2001.
128. **Holloszy JO.** Skeletal muscle "mitochondrial deficiency" does not mediate insulin resistance. *Am J Clin Nutr* 89: 463S-466S, 2009.
129. **Holloszy JO, Oscari LB, Don IJ, and Mole PA.** Mitochondrial citric acid cycle and related enzymes: adaptive response to exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 40: 1368-1373, 1970.

130. **Holloway GP, Benton CR, Mullen KL, Yoshida Y, Snook LA, Han XX, Glatz JF, Luiken JJ, Lally J, Dyck DJ, and Bonen A.** In obese rat muscle transport of palmitate is increased and is channeled to triacylglycerol storage despite an increase in mitochondrial palmitate oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E738-747, 2009.
131. **Holloway GP, Bezaire V, Heigenhauser GJ, Tandon NN, Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A, and Spriet LL.** Mitochondrial long chain fatty acid oxidation, fatty acid translocase/CD36 content and carnitine palmitoyltransferase I activity in human skeletal muscle during aerobic exercise. *J Physiol* 571: 201-210, 2006.
132. **Holloway GP, Bonen A, and Spriet LL.** Regulation of skeletal muscle mitochondrial fatty acid metabolism in lean and obese individuals. *Am J Clin Nutr* 89: 455S-462S, 2009.
133. **Holloway GP, Jain SS, Bezaire V, Han XX, Glatz JF, Luiken JJ, Harper ME, and Bonen A.** FAT/CD36-null mice reveal that mitochondrial FAT/CD36 is required to upregulate mitochondrial fatty acid oxidation in contracting muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: R960-967, 2009.
134. **Holloway GP, Lally J, Nickerson JG, Alkhateeb H, Snook LA, Heigenhauser GJ, Calles-Escandon J, Glatz JF, Luiken JJ, Spriet LL, and Bonen A.** Fatty acid binding protein facilitates sarcolemmal fatty acid transport but not mitochondrial oxidation in rat and human skeletal muscle. *J Physiol* 582: 393-405, 2007.
135. **Holness MJ, Bulmer K, Gibbons GF, and Sugden MC.** Up-regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoform 4 (PDK4) protein expression in oxidative skeletal muscle does not require the obligatory participation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *Biochem J* 366: 839-846, 2002.
136. **Holness MJ, Kraus A, Harris RA, and Sugden MC.** Targeted upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK)-4 in slow-twitch skeletal muscle underlies the stable modification of the regulatory characteristics of PDK induced by high-fat feeding. *Diabetes* 49: 775-781, 2000.
137. **Hondares E, Pineda-Torra I, Iglesias R, Staels B, Villarroya F, and Giralt M.** PPARdelta, but not PPARalpha, activates PGC-1alpha gene transcription in muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 1021-1027, 2007.
138. **Hoppeler H, Klossner S, and Vogt M.** Training in hypoxia and its effects on skeletal muscle tissue. *Scand J Med Sci Sports* 18 Suppl 1: 38-49, 2008.
139. **Hoppeler H, Vogt M, Weibel ER, and Fluck M.** Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia. *Exp Physiol* 88: 109-119, 2003.
140. **Horak P, Crawford AR, Vadysirisack DD, Nash ZM, DeYoung MP, Sgroi D, and Ellisen LW.** Negative feedback control of HIF-1 through REDD1-regulated ROS suppresses tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 4675-4680, 2010.
141. **Horowitz JF, Leone TC, Feng W, Kelly DP, and Klein S.** Effect of endurance training on lipid metabolism in women: a potential role for PPARalpha in the metabolic response to training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E348-355, 2000.
142. **Houten SM, Chegary M, Te Brinke H, Wijnen WJ, Glatz JF, Luiken JJ, Wijburg FA, and Wanders RJ.** Pyruvate dehydrogenase kinase 4 expression is synergistically induced by AMP-activated protein kinase and fatty acids. *Cell Mol Life Sci* 66: 1283-1294, 2009.
143. **Howald H, Pette D, Simoneau JA, Uber A, Hoppeler H, and Cerretelli P.** Effect of chronic hypoxia on muscle enzyme activities. *Int J Sports Med* 11 Suppl 1: S10-14, 1990.
144. **Hue L, and Taegtmeier H.** The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E578-591, 2009.
145. **Huss JM, Levy FH, and Kelly DP.** Hypoxia inhibits the peroxisome proliferator-activated receptor alpha/retinoid X receptor gene regulatory pathway in cardiac myocytes: a mechanism for O<sub>2</sub>-dependent modulation of mitochondrial fatty acid oxidation. *J Biol Chem* 276: 27605-27612, 2001.
146. **Hutber CA, Rasmussen BB, and Winder WW.** Endurance training attenuates the decrease in skeletal muscle malonyl-CoA with exercise. *J Appl Physiol* 83: 1917-1922, 1997.
147. **Irrcher I, Ljubic V, and Hood DA.** Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1alpha transcription in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 296: C116-123, 2009.
148. **Irrcher I, Ljubic V, Kirwan AF, and Hood DA.** AMP-activated protein kinase-regulated activation of the PGC-1alpha promoter in skeletal muscle cells. *PLoS One* 3: e3614, 2008.
149. **Jager S, Handschin C, St-Pierre J, and Spiegelman BM.** AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12017-12022, 2007.
150. **Jiang N, Zhang G, Bo H, Qu J, Ma G, Cao D, Wen L, Liu S, Ji LL, and Zhang Y.** Upregulation of uncoupling protein-3 in skeletal muscle during exercise: a potential antioxidant function. *Free Radic Biol Med* 46: 138-145, 2009.

151. **Jimenez M, Yvon C, Lehr L, Leger B, Keller P, Russell A, Kuhne F, Flandin P, Giacobino JP, and Muzzin P.** Expression of uncoupling protein-3 in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria of various mouse muscle types and its modulation by fasting. *Eur J Biochem* 269: 2878-2884, 2002.
152. **Jong-Yeon K, Hickner RC, Dohm GL, and Houmard JA.** Long- and medium-chain fatty acid oxidation is increased in exercise-trained human skeletal muscle. *Metabolism* 51: 460-464, 2002.
153. **Jorgensen SB, Wojtaszewski JF, Viollet B, Andreelli F, Birk JB, Hellsten Y, Schjerling P, Vaultont S, Neuffer PD, Richter EA, and Pilegaard H.** Effects of alpha-AMPK knockout on exercise-induced gene activation in mouse skeletal muscle. *FASEB J* 19: 1146-1148, 2005.
154. **Jucker BM, Doe CP, Schnackenberg CG, Olzinski AR, Maniscalco K, Williams C, Hu TC, Lenhard SC, Costell M, Bernard R, Sarov-Blat L, Steplewski K, and Willette RN.** PPARdelta activation normalizes cardiac substrate metabolism and reduces right ventricular hypertrophy in congestive heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 50: 25-34, 2007.
155. **Jucker BM, Yang D, Casey WM, Olzinski AR, Williams C, Lenhard SC, Legos JJ, Hawk CT, Sarkar SK, and Newsholme SJ.** Selective PPARdelta agonist treatment increases skeletal muscle lipid metabolism without altering mitochondrial energy coupling: an in vivo magnetic resonance spectroscopy study. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E1256-1264, 2007.
156. **Kalinowska A, Gorski J, Harasim E, Harasiuk D, Bonen A, and Chabowski A.** Differential effects of chronic, in vivo, PPAR's stimulation on the myocardial subcellular redistribution of FAT/CD36 and FABPpm. *FEBS Lett* 583: 2527-2534, 2009.
157. **Kayser B, Hoppeler H, Desplanches D, Marconi C, Broers B, and Cerretelli P.** Muscle ultrastructure and biochemistry of lowland Tibetans. *J Appl Physiol* 81: 419-425, 1996.
158. **Kelley DE, and Goodpaster BH.** Skeletal muscle triglyceride. An aspect of regional adiposity and insulin resistance. *Diabetes Care* 24: 933-941, 2001.
159. **Kelley DE, Goodpaster BH, and Storlien L.** Muscle triglyceride and insulin resistance. *Annu Rev Nutr* 22: 325-346, 2002.
160. **Kelley DE, and Mandarino LJ.** Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes* 49: 677-683, 2000.
161. **Kelley GA, and Kelley KS.** Aerobic exercise and HDL2-C: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis* 184: 207-215, 2006.
162. **Kelley GA, and Kelley KS.** Effects of aerobic exercise on lipids and lipoproteins in adults with type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized-controlled trials. *Public Health* 121: 643-655, 2007.
163. **Kelley SO, Steinberg SV, and Schimmel P.** Functional defects of pathogenic human mitochondrial tRNAs related to structural fragility. *Nat Struct Biol* 7: 862-865, 2000.
164. **Kelly DP.** Hypoxic reprogramming. *Nat Genet* 40: 132-134, 2008.
165. **Kennedy SL, Stanley WC, Panchal AR, and Mazzeo RS.** Alterations in enzymes involved in fat metabolism after acute and chronic altitude exposure. *J Appl Physiol* 90: 17-22, 2001.
166. **Kerner J, Distler AM, Minkler P, Parland W, Peterman SM, and Hoppel CL.** Phosphorylation of rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase-I: effect on the kinetic properties of the enzyme. *J Biol Chem* 279: 41104-41113, 2004.
167. **Kerner J, and Hoppel C.** Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1486: 1-17, 2000.
168. **Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, and Wahli W.** Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 103: 1489-1498, 1999.
169. **Kiens B.** Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance. *Physiol Rev* 86: 205-243, 2006.
170. **Kiilerich K, Adser H, Jakobsen AH, Pedersen PA, Hardie DG, Wojtaszewski JF, and Pilegaard H.** PGC-1alpha increases PDH content but does not change acute PDH regulation in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299: R1350-1359, 2010.
171. **Kim JW, Tchernyshov I, Semenza GL, and Dang CV.** HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3: 177-185, 2006.
172. **Kim JY, Koves TR, Yu GS, Gulick T, Cortright RN, Dohm GL, and Muoio DM.** Evidence of a malonyl-CoA-insensitive carnitine palmitoyltransferase I activity in red skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E1014-1022, 2002.

173. **King KL, Stanley WC, Rosca M, Kerner J, Hoppel CL, and Febbraio M.** Fatty acid oxidation in cardiac and skeletal muscle mitochondria is unaffected by deletion of CD36. *Arch Biochem Biophys* 467: 234-238, 2007.
174. **Kleiner S, Nguyen-Tran V, Bare O, Huang X, Spiegelman B, and Wu Z.** PPAR $\{\delta\}$  agonism activates fatty acid oxidation via PGC-1 $\{\alpha\}$  but does not increase mitochondrial gene expression and function. *J Biol Chem* 284: 18624-18633, 2009.
175. **Koonen DP, Glatz JF, Bonen A, and Luiken JJ.** Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1736: 163-180, 2005.
176. **Koulmann N, Novel-Chate V, Peinnequin A, Chapot R, Serrurier B, Simler N, Richard H, Ventura-Clapier R, and Bigard X.** Cyclosporin A inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension and right ventricle hypertrophy. *Am J Respir Crit Care Med* 174: 699-705, 2006.
177. **Koves TR, Li P, An J, Akimoto T, Slentz D, Ilkayeva O, Dohm GL, Yan Z, Newgard CB, and Muoio DM.** Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 $\alpha$ -mediated metabolic remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency. *J Biol Chem* 280: 33588-33598, 2005.
178. **Koves TR, Noland RC, Bates AL, Henes ST, Muoio DM, and Cortright RN.** Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria play distinct roles in regulating skeletal muscle fatty acid metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C1074-1082, 2005.
179. **Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, Bain J, Stevens R, Dyck JR, Newgard CB, Lopaschuk GD, and Muoio DM.** Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab* 7: 45-56, 2008.
180. **Kramer DK, Al-Khalili L, Guigas B, Leng Y, Garcia-Roves PM, and Krook A.** Role of AMP kinase and PPAR $\delta$  in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. *J Biol Chem* 282: 19313-19320, 2007.
181. **Krishnan J, Suter M, Windak R, Krebs T, Felley A, Montessuit C, Tokarska-Schlattner M, Aasum E, Bogdanova A, Perriard E, Perriard JC, Larsen T, Pedrazzini T, and Krek W.** Activation of a HIF1 $\alpha$ -PPAR $\gamma$  axis underlies the integration of glycolytic and lipid anabolic pathways in pathologic cardiac hypertrophy. *Cell Metab* 9: 512-524, 2009.
182. **Kuhl JE, Ruderman NB, Musi N, Goodyear LJ, Patti ME, Crunkhorn S, Dronamraju D, Thorell A, Nygren J, Ljungkvist O, Degerblad M, Stahle A, Brismar TB, Andersen KL, Saha AK, Efendic S, and Bavenholm PN.** Exercise training decreases the concentration of malonyl-CoA and increases the expression and activity of malonyl-CoA decarboxylase in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E1296-1303, 2006.
183. **Kusuhara K, Madsen K, Jensen L, Hellsten Y, and Pilegaard H.** Calcium signalling in the regulation of PGC-1 $\alpha$ , PDK4 and HKII mRNA expression. *Biol Chem* 388: 481-488, 2007.
184. **Kuznetsov AV, Tiivel T, Sikk P, Kaambre T, Kay L, Daneshrad Z, Rossi A, Kadaja L, Peet N, Seppet E, and Saks VA.** Striking differences between the kinetics of regulation of respiration by ADP in slow-twitch and fast-twitch muscles in vivo. *Eur J Biochem* 241: 909-915, 1996.
185. **Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, and Kunz WS.** Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 3: 965-976, 2008.
186. **Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, and Auwerx J.** Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell* 127: 1109-1122, 2006.
187. **Lambert CM, Roy M, Robitaille GA, Richard DE, and Bonnet S.** HIF-1 inhibition decreases systemic vascular remodelling diseases by promoting apoptosis through a hexokinase 2-dependent mechanism. *Cardiovasc Res* 88: 196-204, 2010.
188. **Lambert K, Py G, Eydoux N, Matecki S, Ramonatxo M, Prefaut C, and Mercier J.** Effect of food restriction on lactate sarcolemmal transport. *Metabolism* 52: 322-327, 2003.
189. **Leary SC, Lyons CN, Rosenberger AG, Ballantyne JS, Stillman J, and Moyes CD.** Fiber-type differences in muscle mitochondrial profiles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R817-826, 2003.
190. **LeBlanc PJ, Peters SJ, Tunstall RJ, Cameron-Smith D, and Heigenhauser GJ.** Effects of aerobic training on pyruvate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinase in human skeletal muscle. *J Physiol* 557: 559-570, 2004.
191. **Lee CH, Olson P, Hevener A, Mehl I, Chong LW, Olefsky JM, Gonzalez FJ, Ham J, Kang H, Peters JM, and Evans RM.** PPAR $\delta$  regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 3444-3449, 2006.

192. **Lee FN, Zhang L, Zheng D, Choi WS, and Youn JH.** Insulin suppresses PDK-4 expression in skeletal muscle independently of plasma FFA. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E69-74, 2004.
193. **Lee WH, and Kim SG.** AMPK-Dependent Metabolic Regulation by PPAR Agonists. *PPAR Res* 2010: 2010.
194. **Leick L, Wojtaszewski JF, Johansen ST, Küllerich K, Comes G, Hellsten Y, Hidalgo J, and Pilegaard H.** PGC-1 $\alpha$  is not mandatory for exercise- and training-induced adaptive gene responses in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E463-474, 2008.
195. **Letout A.** Effet de l'hypoxie sur le phénotype musculaire, de l'exposition aigüe à l'adaptation naturelle. Lyon: Université Claude Bernard, 2006, p. 214.
196. **Leverve XM.** Mitochondrial function and substrate availability. *Crit Care Med* 35: S454-460, 2007.
197. **Levine BD, and Stray-Gundersen J.** Point: positive effects of intermittent hypoxia (live high:train low) on exercise performance are mediated primarily by augmented red cell volume. *J Appl Physiol* 99: 2053-2055, 2005.
198. **Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, and Park JW.** Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Mol Cell* 38: 864-878, 2010.
199. **Liu HY, Zheng G, Zhu H, and Woldegiorgis G.** Hormonal and nutritional regulation of muscle carnitine palmitoyltransferase I gene expression in vivo. *Arch Biochem Biophys* 465: 437-442, 2007.
200. **Liu Y, Wan Q, Guan Q, Gao L, and Zhao J.** High-fat diet feeding impairs both the expression and activity of AMPKa in rats' skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 339: 701-707, 2006.
201. **Livak KJ, and Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408, 2001.
202. **Lu Z, and Sack MN.** ATF-1 is a hypoxia-responsive transcriptional activator of skeletal muscle mitochondrial-uncoupling protein 3. *J Biol Chem* 283: 23410-23418, 2008.
203. **Luiken JJ, Dyck DJ, Han XX, Tandon NN, Arumugam Y, Glatz JF, and Bonen A.** Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E491-495, 2002.
204. **Luiken JJ, Schaap FG, van Nieuwenhoven FA, van der Vusse GJ, Bonen A, and Glatz JF.** Cellular fatty acid transport in heart and skeletal muscle as facilitated by proteins. *Lipids* 34 Suppl: S169-175, 1999.
205. **Lundby C, and Van Hall G.** Substrate utilization in sea level residents during exercise in acute hypoxia and after 4 weeks of acclimatization to 4100 m. *Acta Physiol Scand* 176: 195-201, 2002.
206. **Lunde IG, Anton SL, Bruusgaard JC, Rana ZA, Ellefsen S, and Gundersen K.** Hypoxia inducible factor 1 {alpha} links fast-patterned muscle activity and fast muscle phenotype in rats. *J Physiol* 2011.
207. **Lunde IG, Ekmark M, Rana ZA, Buonanno A, and Gundersen K.** PPARdelta expression is influenced by muscle activity and induces slow muscle properties in adult rat muscles after somatic gene transfer. *J Physiol* 582: 1277-1287, 2007.
208. **Luquet S, Lopez-Soriano J, Holst D, Fredenrich A, Melki J, Rassoulzadegan M, and Grimaldi PA.** Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *FASEB J* 17: 2299-2301, 2003.
209. **Magalhaes J, Ascensao A, Soares JM, Ferreira R, Neuparth MJ, Marques F, and Duarte JA.** Acute and severe hypobaric hypoxia increases oxidative stress and impairs mitochondrial function in mouse skeletal muscle. *J Appl Physiol* 99: 1247-1253, 2005.
210. **Mascaro C, Acosta E, Ortiz JA, Marrero PF, Hegardt FG, and Haro D.** Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 273: 8560-8563, 1998.
211. **Mason SD, Rundqvist H, Papandreou I, Duh R, McNulty WJ, Howlett RA, Olfert IM, Sundberg CJ, Denko NC, Poellinger L, and Johnson RS.** HIF-1 $\alpha$  in endurance training: suppression of oxidative metabolism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R2059-2069, 2007.
212. **Masternak MM, and Bartke A.** PPARs in Calorie Restricted and Genetically Long-Lived Mice. *PPAR Res* 2007: 28436, 2007.
213. **Mazat JP, Letellier T, Bedes F, Malgat M, Korzeniewski B, Jouaville LS, and Morkuniene R.** Metabolic control analysis and threshold effect in oxidative phosphorylation: implications for mitochondrial pathologies. *Mol Cell Biochem* 174: 143-148, 1997.
214. **Mazzeo RS, Brooks GA, Butterfield GE, Cymerman A, Roberts AC, Selland M, Wolfel EE, and Reeves JT.** Beta-adrenergic blockade does not prevent the lactate response to exercise after acclimatization to high altitude. *J Appl Physiol* 76: 610-615, 1994.
215. **McClelland GB, and Brooks GA.** Changes in MCT 1, MCT 4, and LDH expression are tissue specific in rats after long-term hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol* 92: 1573-1584, 2002.

216. **McClelland GB, Hochachka PW, and Weber JM.** Effect of high-altitude acclimation on NEFA turnover and lipid utilization during exercise in rats. *Am J Physiol* 277: E1095-1102, 1999.
217. **McGarry JD.** Glucose-fatty acid interactions in health and disease. *Am J Clin Nutr* 67: 500S-504S, 1998.
218. **McGarry JD, and Brown NF.** The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 244: 1-14, 1997.
219. **McGarry JD, Mannaerts GP, and Foster DW.** A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J Clin Invest* 60: 265-270, 1977.
220. **Mole PA, Oscari LB, and Holloszy JO.** Adaptation of muscle to exercise. Increase in levels of palmitoyl Coa synthetase, carnitine palmitoyltransferase, and palmitoyl Coa dehydrogenase, and in the capacity to oxidize fatty acids. *J Clin Invest* 50: 2323-2330, 1971.
221. **Morash AJ, Kajimura M, and McClelland GB.** Intertissue regulation of carnitine palmitoyltransferase I (CPTI): mitochondrial membrane properties and gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochim Biophys Acta* 1778: 1382-1389, 2008.
222. **Mozo J, Ferry G, Studeny A, Pecqueur C, Rodriguez M, Boutin JA, and Bouillaud F.** Expression of UCP3 in CHO cells does not cause uncoupling, but controls mitochondrial activity in the presence of glucose. *Biochem J* 393: 431-439, 2006.
223. **Muoio DM, and Koves TR.** Skeletal muscle adaptation to fatty acid depends on coordinated actions of the PPARs and PGC1 alpha: implications for metabolic disease. *Appl Physiol Nutr Metab* 32: 874-883, 2007.
224. **Muoio DM, MacLean PS, Lang DB, Li S, Houmard JA, Way JM, Winegar DA, Corton JC, Dohm GL, and Kraus WE.** Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta. *J Biol Chem* 277: 26089-26097, 2002.
225. **Nahle Z, Hsieh M, Pietka T, Coburn CT, Grimaldi PA, Zhang MQ, Das D, and Abumrad NA.** CD36-dependent regulation of muscle FoxO1 and PDK4 in the PPAR delta/beta-mediated adaptation to metabolic stress. *J Biol Chem* 283: 14317-14326, 2008.
226. **Narkar VA, Downes M, Yu RT, Embler E, Wang YX, Banayo E, Mihaylova MM, Nelson MC, Zou Y, Juguilon H, Kang H, Shaw RJ, and Evans RM.** AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell* 134: 405-415, 2008.
227. **Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, and Carruba MO.** Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 310: 314-317, 2005.
228. **Odland LM, Heigenhauser GJ, and Spriet LL.** Effects of high fat provision on muscle PDH activation and malonyl-CoA content in moderate exercise. *J Appl Physiol* 89: 2352-2358, 2000.
229. **Okazaki M, Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T, Tsugita M, Nakayama S, Kambayashi M, Hashimoto K, and Terada Y.** PPARbeta/delta regulates the human SIRT1 gene transcription via Sp1. *Endocr J* 57: 403-413, 2010.
230. **Olesen J, Kiilerich K, and Pilegaard H.** PGC-1alpha-mediated adaptations in skeletal muscle. *Pflugers Arch* 460: 153-162, 2010.
231. **Oliver WR, Jr., Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznajdman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Kliewer SA, Hansen BC, and Willson TM.** A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5306-5311, 2001.
232. **Ou LC, and Leiter JC.** Effects of exposure to a simulated altitude of 5500 m on energy metabolic pathways in rats. *Respir Physiol Neurobiol* 141: 59-71, 2004.
233. **Pande SV, and Blanchaer MC.** Carbohydrate and fat in energy metabolism of red and white muscle. *Am J Physiol* 220: 549-553, 1971.
234. **Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, and Denko NC.** HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 3: 187-197, 2006.
235. **Peronnet F, Massicotte D, Folch N, Melin B, Koulmann N, Jimenez C, Bourdon L, Launay JC, and Savourey G.** Substrate utilization during prolonged exercise with ingestion of (13)C-glucose in acute hypobaric hypoxia (4,300 m). *Eur J Appl Physiol* 97: 527-534, 2006.
236. **Peters JM, Aoyama T, Burns AM, and Gonzalez FJ.** Bezafibrate is a dual ligand for PPARalpha and PPARbeta: studies using null mice. *Biochim Biophys Acta* 1632: 80-89, 2003.
237. **Peters SJ, Harris RA, Heigenhauser GJ, and Spriet LL.** Muscle fiber type comparison of PDH kinase activity and isoform expression in fed and fasted rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R661-668, 2001.

238. **Peters SJ, Harris RA, Wu P, Pehleman TL, Heigenhauser GJ, and Spriet LL.** Human skeletal muscle PDH kinase activity and isoform expression during a 3-day high-fat/low-carbohydrate diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E1151-1158, 2001.
239. **Pfeifer MA, Halter JB, Beard JC, Judzewitsch R, and Porte D, Jr.** Insulin responses to nonglucose stimuli in non-insulin-dependent diabetes mellitus during a tolbutamide infusion. *Diabetes* 31: 154-159, 1982.
240. **Piao L, Fang YH, Cadete VJ, Wietholt C, Urboniene D, Toth PT, Marsboom G, Zhang HJ, Haber I, Rehman J, Lopaschuk GD, and Archer SL.** The inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase improves impaired cardiac function and electrical remodeling in two models of right ventricular hypertrophy: resuscitating the hibernating right ventricle. *J Mol Med* 88: 47-60, 2010.
241. **Pilegaard H, Osada T, Andersen LT, Helge JW, Saltin B, and Neufer PD.** Substrate availability and transcriptional regulation of metabolic genes in human skeletal muscle during recovery from exercise. *Metabolism* 54: 1048-1055, 2005.
242. **Pisani DF, and Dechesne CA.** Skeletal muscle HIF-1 $\alpha$  expression is dependent on muscle fiber type. *J Gen Physiol* 126: 173-178, 2005.
243. **Ponsot E, Dufour SP, Zoll J, Doutrelou S, N'Guessan B, Geny B, Hoppeler H, Lampert E, Mettauer B, Ventura-Clapier R, and Richard R.** Exercise training in normobaric hypoxia in endurance runners. II. Improvement of mitochondrial properties in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 100: 1249-1257, 2006.
244. **Ponsot E, Zoll J, N'Guessan B, Ribera F, Lampert E, Richard R, Veksler V, Ventura-Clapier R, and Mettauer B.** Mitochondrial tissue specificity of substrates utilization in rat cardiac and skeletal muscles. *J Cell Physiol* 203: 479-486, 2005.
245. **Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, and Spiegelman BM.** A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92: 829-839, 1998.
246. **Py G, Eydoux N, Lambert K, Chapot R, Koulmann N, Sanchez H, Bahi L, Peinnequin A, Mercier J, and Bigard AX.** Role of hypoxia-induced anorexia and right ventricular hypertrophy on lactate transport and MCT expression in rat muscle. *Metabolism* 54: 634-644, 2005.
247. **Randle PJ, Garland PB, Hales CN, and Newsholme EA.** The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1: 785-789, 1963.
248. **Ravnskjaer K, Frigerio F, Boergesen M, Nielsen T, Maechler P, and Mandrup S.** PPAR $\delta$  is a fatty acid sensor that enhances mitochondrial oxidation in insulin-secreting cells and protects against fatty acid-induced dysfunction. *J Lipid Res* 51: 1370-1379, 2010.
249. **Ray J, Noll F, Daut J, and Hanley PJ.** Long-chain fatty acids increase basal metabolism and depolarize mitochondria in cardiac muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H1495-1501, 2002.
250. **Razeghi P, Young ME, Abbasi S, and Taegtmeyer H.** Hypoxia in vivo decreases peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -regulated gene expression in rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 5-10, 2001.
251. **Regnault TR, Zhao L, Chiu JS, Gottheil SK, Foran A, and Yee SP.** Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\beta/\delta$ ,  $\gamma$  Agonists and Resveratrol Modulate Hypoxia Induced Changes in Nuclear Receptor Activators of Muscle Oxidative Metabolism. *PPAR Res* 2010: 129173, 2010.
252. **Richardson DK, Kashyap S, Bajaj M, Cusi K, Mandarino SJ, Finlayson J, DeFronzo RA, Jenkinson CP, and Mandarino LJ.** Lipid infusion decreases the expression of nuclear encoded mitochondrial genes and increases the expression of extracellular matrix genes in human skeletal muscle. *J Biol Chem* 280: 10290-10297, 2005.
253. **Richardson RS, Duteil S, Wary C, Wray DW, Hoff J, and Carlier PG.** Human skeletal muscle intracellular oxygenation: the impact of ambient oxygen availability. *J Physiol* 571: 415-424, 2006.
254. **Richardson RS, Knight DR, Poole DC, Kurdak SS, Hogan MC, Grassi B, and Wagner PD.** Determinants of maximal exercise VO<sub>2</sub> during single leg knee-extensor exercise in humans. *Am J Physiol* 268: H1453-1461, 1995.
255. **Richardson RS, Leigh JS, Wagner PD, and Noyszewski EA.** Cellular PO<sub>2</sub> as a determinant of maximal mitochondrial O<sub>2</sub> consumption in trained human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 87: 325-331, 1999.
256. **Richardson RS, Noyszewski EA, Kendrick KF, Leigh JS, and Wagner PD.** Myoglobin O<sub>2</sub> desaturation during exercise. Evidence of limited O<sub>2</sub> transport. *J Clin Invest* 96: 1916-1926, 1995.
257. **Riserus U, Sprecher D, Johnson T, Olson E, Hirschberg S, Liu A, Fang Z, Hegde P, Richards D, Sarov-Blat L, Strum JC, Basu S, Cheeseman J, Fielding BA, Humphreys SM, Danoff T, Moore NR, Murgatroyd P, O'Rahilly S, Sutton P, Willson T, Hassall D, Frayn KN, and Karpe F.** Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\delta$  promotes reversal of multiple metabolic abnormalities, reduces oxidative stress, and increases fatty acid oxidation in moderately obese men. *Diabetes* 57: 332-339, 2008.

258. **Roberts AC, Butterfield GE, Cymerman A, Reeves JT, Wolfel EE, and Brooks GA.** Acclimatization to 4,300-m altitude decreases reliance on fat as a substrate. *J Appl Physiol* 81: 1762-1771, 1996.
259. **Robinson DM, Ogilvie RW, Tullson PC, and Terjung RL.** Increased peak oxygen consumption of trained muscle requires increased electron flux capacity. *J Appl Physiol* 77: 1941-1952, 1994.
260. **Roepstorff C, Halberg N, Hillig T, Saha AK, Ruderman NB, Wojtaszewski JF, Richter EA, and Kiens B.** Malonyl-CoA and carnitine in regulation of fat oxidation in human skeletal muscle during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E133-142, 2005.
261. **Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Gastaldelli A, Horowitz JF, Endert E, and Wolfe RR.** Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am J Physiol* 265: E380-391, 1993.
262. **Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Rosenblatt J, and Wolfe RR.** Substrate metabolism during different exercise intensities in endurance-trained women. *J Appl Physiol* 88: 1707-1714, 2000.
263. **Rossignol F, Solares M, Balanza E, Coudert J, and Clottes E.** Expression of lactate dehydrogenase A and B genes in different tissues of rats adapted to chronic hypobaric hypoxia. *J Cell Biochem* 89: 67-79, 2003.
264. **Rossignol R, Letellier T, Malgat M, Rocher C, and Mazat JP.** Tissue variation in the control of oxidative phosphorylation: implication for mitochondrial diseases. *Biochem J* 347 Pt 1: 45-53, 2000.
265. **Rousset S, Alves-Guerra MC, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulier AM, Bouillaud F, and Ricquier D.** The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* 53 Suppl 1: S130-135, 2004.
266. **Ruderman NB, Saha AK, and Kraegen EW.** Minireview: malonyl CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity. *Endocrinology* 144: 5166-5171, 2003.
267. **Russell AP, Hesselink MK, Lo SK, and Schrauwen P.** Regulation of metabolic transcriptional co-activators and transcription factors with acute exercise. *FASEB J* 19: 986-988, 2005.
268. **Sahlin K.** Control of lipid oxidation at the mitochondrial level. *Appl Physiol Nutr Metab* 34: 382-388, 2009.
269. **Sahlin K, Mogensen M, Bagger M, Fernstrom M, and Pedersen PK.** The potential for mitochondrial fat oxidation in human skeletal muscle influences whole body fat oxidation during low-intensity exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E223-230, 2007.
270. **Samec S, Seydoux J, and Dulloo AG.** Interorgan signaling between adipose tissue metabolism and skeletal muscle uncoupling protein homologs: is there a role for circulating free fatty acids? *Diabetes* 47: 1693-1698, 1998.
271. **Samec S, Seydoux J, and Dulloo AG.** Role of UCP homologues in skeletal muscles and brown adipose tissue: mediators of thermogenesis or regulators of lipids as fuel substrate? *FASEB J* 12: 715-724, 1998.
272. **Scatena R, Bottoni P, Martorana GE, Ferrari F, De Sole P, Rossi C, and Giardina B.** Mitochondrial respiratory chain dysfunction, a non-receptor-mediated effect of synthetic PPAR-ligands: biochemical and pharmacological implications. *Biochem Biophys Res Commun* 319: 967-973, 2004.
273. **Schantz PG, Sjoberg B, and Svedenhag J.** Malate-aspartate and alpha-glycerophosphate shuttle enzyme levels in human skeletal muscle: methodological considerations and effect of endurance training. *Acta Physiol Scand* 128: 397-407, 1986.
274. **Schenk S, and Horowitz JF.** Coimmunoprecipitation of FAT/CD36 and CPT I in skeletal muscle increases proportionally with fat oxidation after endurance exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E254-260, 2006.
275. **Schmutz S, Dapp C, Wittwer M, Durieux AC, Mueller M, Weinstein F, Vogt M, Hoppeler H, and Fluck M.** A hypoxia complement differentiates the muscle response to endurance exercise. *Exp Physiol* 95: 723-735, 2010.
276. **Schrauwen P, van Aggel-Leijssen DP, Hul G, Wagenmakers AJ, Vidal H, Saris WH, and van Baak MA.** The effect of a 3-month low-intensity endurance training program on fat oxidation and acetyl-CoA carboxylase-2 expression. *Diabetes* 51: 2220-2226, 2002.
277. **Schuler M, Ali F, Chambon C, Duteil D, Bornert JM, Tardivel A, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, and Metzger D.** PGC1alpha expression is controlled in skeletal muscles by PPARbeta, whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes. *Cell Metab* 4: 407-414, 2006.
278. **Seifert EL, Bezaire V, Estey C, and Harper ME.** Essential role for uncoupling protein-3 in mitochondrial adaptation to fasting but not in fatty acid oxidation or fatty acid anion export. *J Biol Chem* 283: 25124-25131, 2008.
279. **Semenza GL.** Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J* 405: 1-9, 2007.

280. **Sharma S, Taegtmeier H, Adrogue J, Razeghi P, Sen S, Ngumbela K, and Essop MF.** Dynamic changes of gene expression in hypoxia-induced right ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1185-1192, 2004.
281. **Sibille B, Filippi C, Piquet MA, Leclercq P, Fontaine E, Ronot X, Rigoulet M, and Leverve X.** The mitochondrial consequences of uncoupling intact cells depend on the nature of the exogenous substrate. *Biochem J* 355: 231-235, 2001.
282. **Sidossis LS, Gastaldelli A, Klein S, and Wolfe RR.** Regulation of plasma fatty acid oxidation during low- and high-intensity exercise. *Am J Physiol* 272: E1065-1070, 1997.
283. **Sidossis LS, Wolfe RR, and Coggan AR.** Regulation of fatty acid oxidation in untrained vs. trained men during exercise. *Am J Physiol* 274: E510-515, 1998.
284. **Silveira LR, Pilegaard H, Kusunaga K, Curi R, and Hellsten Y.** The contraction induced increase in gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha), mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) and hexokinase II (HKII) in primary rat skeletal muscle cells is dependent on reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 1763: 969-976, 2006.
285. **Simler N, Malgoyre A, and Koulmann N.** Hypoxic stimulus alters hypothalamic AMP-activated protein kinase phosphorylation concomitant to hypophagia. *J Appl Physiol* 102: 2135-2141, 2007.
286. **Solanes G, Pedraza N, Iglesias R, Giralt M, and Villarroya F.** Functional relationship between MyoD and peroxisome proliferator-activated receptor-dependent regulatory pathways in the control of the human uncoupling protein-3 gene transcription. *Mol Endocrinol* 17: 1944-1958, 2003.
287. **Solanes G, Pedraza N, Iglesias R, Giralt M, and Villarroya F.** The human uncoupling protein-3 gene promoter requires MyoD and is induced by retinoic acid in muscle cells. *FASEB J* 14: 2141-2143, 2000.
288. **Sparks LM, Xie H, Koza RA, Mynatt R, Hulver MW, Bray GA, and Smith SR.** A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes* 54: 1926-1933, 2005.
289. **Sprecher DL, Massien C, Pearce G, Billin AN, Perlstein I, Willson TM, Hassall DG, Ancellin N, Patterson SD, Lobe DC, and Johnson TG.** Triglyceride:high-density lipoprotein cholesterol effects in healthy subjects administered a peroxisome proliferator activated receptor delta agonist. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 359-365, 2007.
290. **Sriwijitkamol A, Ivy JL, Christ-Roberts C, DeFronzo RA, Mandarino LJ, and Musi N.** LKB1-AMPK signaling in muscle from obese insulin-resistant Zucker rats and effects of training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E925-932, 2006.
291. **Starritt EC, Howlett RA, Heigenhauser GJ, and Spriet LL.** Sensitivity of CPT I to malonyl-CoA in trained and untrained human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E462-468, 2000.
292. **Stellingwerff T, Watt MJ, Heigenhauser GJ, and Spriet LL.** Effects of reduced free fatty acid availability on skeletal muscle PDH activation during aerobic exercise. Pyruvate dehydrogenase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E589-596, 2003.
293. **Stephens FB, Constantin-Teodosiu D, and Greenhaff PL.** New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J Physiol* 581: 431-444, 2007.
294. **Sutendra G, Bonnet S, Rochefort G, Haromy A, Folmes KD, Lopaschuk GD, Dyck JR, and Michelakis ED.** Fatty acid oxidation and malonyl-CoA decarboxylase in the vascular remodeling of pulmonary hypertension. *Sci Transl Med* 2: 44ra58, 2010.
295. **Sznajdman ML, Haffner CD, Maloney PR, Fivush A, Chao E, Goreham D, Sierra ML, LeGrumelec C, Xu HE, Montana VG, Lambert MH, Willson TM, Oliver WR, Jr., and Sternbach DD.** Novel selective small molecule agonists for peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)--synthesis and biological activity. *Bioorg Med Chem Lett* 13: 1517-1521, 2003.
296. **Takahashi S, Tanaka T, Kodama T, and Sakai J.** Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta), a novel target site for drug discovery in metabolic syndrome. *Pharmacol Res* 53: 501-507, 2006.
297. **Talanian JL, Holloway GP, Snook LA, Heigenhauser GJ, Bonen A, and Spriet LL.** Exercise training increases sarcolemmal and mitochondrial fatty acid transport proteins in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299: E180-188, 2010.
298. **Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, Watanabe M, Magoori K, Ioka RX, Tachibana K, Watanabe Y, Uchiyama Y, Sumi K, Iguchi H, Ito S, Doi T, Hamakubo T, Naito M, Auwerx J, Yanagisawa M, Kodama T, and Sakai J.** Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15924-15929, 2003.
299. **Taylor CT.** Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. *Biochem J* 409: 19-26, 2008.

300. **Terada S, Goto M, Kato M, Kawanaka K, Shimokawa T, and Tabata I.** Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 350-354, 2002.
301. **Thomson DM, Brown JD, Fillmore N, Condon BM, Kim HJ, Barrow JR, and Winder WW.** LKB1 and the regulation of malonyl-CoA and fatty acid oxidation in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E1572-1579, 2007.
302. **Thomson DM, and Winder WW.** AMP-activated protein kinase control of fat metabolism in skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)* 196: 147-154, 2009.
303. **Thyfault JP, Rector RS, and Noland RC.** Metabolic inflexibility in skeletal muscle: a prelude to the cardiometabolic syndrome? *J Cardiometab Syndr* 1: 184-189, 2006.
304. **Toledo FG, Menshikova EV, Ritov VB, Azuma K, Radikova Z, DeLany J, and Kelley DE.** Effects of physical activity and weight loss on skeletal muscle mitochondria and relationship with glucose control in type 2 diabetes. *Diabetes* 56: 2142-2147, 2007.
305. **Tonkonogi M, Harris B, and Sahlin K.** Mitochondrial oxidative function in human saponin-skinned muscle fibres: effects of prolonged exercise. *J Physiol* 510 ( Pt 1): 279-286, 1998.
306. **Tunstall RJ, and Cameron-Smith D.** Effect of elevated lipid concentrations on human skeletal muscle gene expression. *Metabolism* 54: 952-959, 2005.
307. **Tunstall RJ, Mehan KA, Wadley GD, Collier GR, Bonen A, Hargreaves M, and Cameron-Smith D.** Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E66-72, 2002.
308. **van Bilsen M, van Nieuwenhoven FA, and van der Vusse GJ.** Metabolic remodelling of the failing heart: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res* 81: 420-428, 2009.
309. **Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, and Speleman F.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034, 2002.
310. **Veksler VI, Kuznetsov AV, Anflous K, Mateo P, van Deursen J, Wieringa B, and Ventura-Clapier R.** Muscle creatine kinase-deficient mice. II. Cardiac and skeletal muscles exhibit tissue-specific adaptation of the mitochondrial function. *J Biol Chem* 270: 19921-19929, 1995.
311. **Ventura FV, Ruiter J, Ijlst L, de Almeida IT, and Wanders RJ.** Differential inhibitory effect of long-chain acyl-CoA esters on succinate and glutamate transport into rat liver mitochondria and its possible implications for long-chain fatty acid oxidation defects. *Mol Genet Metab* 86: 344-352, 2005.
312. **Vigano A, Ripamonti M, De Palma S, Capitanio D, Vasso M, Wait R, Lundby C, Cerretelli P, and Gelfi C.** Proteins modulation in human skeletal muscle in the early phase of adaptation to hypobaric hypoxia. *Proteomics* 8: 4668-4679, 2008.
313. **Villarroya F, Iglesias R, and Giralt M.** PPARs in the Control of Uncoupling Proteins Gene Expression. *PPAR Res* 2007: 74364, 2007.
314. **Viollet B, Lantier L, Devin-Leclerc J, Hebrard S, Amouyal C, Mounier R, Foretz M, and Andreelli F.** Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front Biosci* 14: 3380-3400, 2009.
315. **Vogt M, and Hoppeler H.** Is hypoxia training good for muscles and exercise performance? *Prog Cardiovasc Dis* 52: 525-533, 2010.
316. **Vogt M, Puntschart A, Geiser J, Zuleger C, Billeter R, and Hoppeler H.** Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. *J Appl Physiol* 91: 173-182, 2001.
317. **Wadley GD, Lee-Young RS, Canny BJ, Wasuntarawat C, Chen ZP, Hargreaves M, Kemp BE, and McConell GK.** Effect of exercise intensity and hypoxia on skeletal muscle AMPK signaling and substrate metabolism in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E694-702, 2006.
318. **Wagner N, Jehl-Pietri C, Lopez P, Murdaca J, Giordano C, Schwartz C, Gounon P, Hatem SN, Grimaldi P, and Wagner KD.** Peroxisome proliferator-activated receptor beta stimulation induces rapid cardiac growth and angiogenesis via direct activation of calcineurin. *Cardiovasc Res* 83: 61-71, 2009.
319. **Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, and Evans RM.** Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113: 159-170, 2003.
320. **Wang YX, Zhang CL, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo CR, Ham J, Kang H, and Evans RM.** Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol* 2: e294, 2004.
321. **Watt MJ, Heigenhauser GJ, LeBlanc PJ, Inglis JG, Spriet LL, and Peters SJ.** Rapid upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase activity in human skeletal muscle during prolonged exercise. *J Appl Physiol* 97: 1261-1267, 2004.

322. **Watt MJ, Southgate RJ, Holmes AG, and Febbraio MA.** Suppression of plasma free fatty acids upregulates peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and delta and PPAR coactivator 1alpha in human skeletal muscle, but not lipid regulatory genes. *J Mol Endocrinol* 33: 533-544, 2004.
323. **Wende AR, Huss JM, Schaeffer PJ, Giguere V, and Kelly DP.** PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. *Mol Cell Biol* 25: 10684-10694, 2005.
324. **Wende AR, Schaeffer PJ, Parker GJ, Zechner C, Han DH, Chen MM, Hancock CR, Lehman JJ, Huss JM, McClain DA, Holloszy JO, and Kelly DP.** A role for the transcriptional coactivator PGC-1alpha in muscle refueling. *J Biol Chem* 282: 36642-36651, 2007.
325. **Wenz T, Diaz F, Spiegelman BM, and Moraes CT.** Activation of the PPAR/PGC-1alpha pathway prevents a bioenergetic deficit and effectively improves a mitochondrial myopathy phenotype. *Cell Metab* 8: 249-256, 2008.
326. **Wetter TJ, Gazdag AC, Dean DJ, and Cartee GD.** Effect of calorie restriction on in vivo glucose metabolism by individual tissues in rats. *Am J Phys Endocrinol Metab* 276: E728-738, 1999.
327. **Wolfe RR.** Fat metabolism in exercise. *Adv Exp Med Biol* 441: 147-156, 1998.
328. **Wu P, Inskeep K, Bowker-Kinley MM, Popov KM, and Harris RA.** Mechanism responsible for inactivation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase complex in starvation and diabetes. *Diabetes* 48: 1593-1599, 1999.
329. **Wu P, Peters JM, and Harris RA.** Adaptive increase in pyruvate dehydrogenase kinase 4 during starvation is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 391-396, 2001.
330. **Yin W, Signore AP, Iwai M, Cao G, Gao Y, and Chen J.** Rapidly increased neuronal mitochondrial biogenesis after hypoxic-ischemic brain injury. *Stroke* 39: 3057-3063, 2008.
331. **Young AJ, Evans WJ, Cymerman A, Pandolf KB, Knapik JJ, and Maher JT.** Sparing effect of chronic high-altitude exposure on muscle glycogen utilization. *J Appl Physiol* 52: 857-862, 1982.
332. **Yu S, and Reddy JK.** Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochim Biophys Acta* 1771: 936-951, 2007.
333. **Zammit VA.** Role of insulin in hepatic fatty acid partitioning: emerging concepts. *Biochem J* 314 ( Pt 1): 1-14, 1996.
334. **Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, Dang CV, and Semenza GL.** HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* 11: 407-420, 2007.
335. **Zhang J, and Ney PA.** Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ* 16: 939-946, 2009.
336. **Zhang Y, Qi H, Taylor R, Xu W, Liu LF, and Jin S.** The role of autophagy in mitochondria maintenance: characterization of mitochondrial functions in autophagy-deficient *S. cerevisiae* strains. *Autophagy* 3: 337-346, 2007.
337. **Zhou M, Lin BZ, Coughlin S, Vallega G, and Pilch PF.** UCP-3 expression in skeletal muscle: effects of exercise, hypoxia, and AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E622-629, 2000.
338. **Zoll J, Koulmann N, Bahi L, Ventura-Clapier R, and Bigard AX.** Quantitative and qualitative adaptation of skeletal muscle mitochondria to increased physical activity. *J Cell Physiol* 194: 186-193, 2003.
339. **Zoll J, Sanchez H, N'Guessan B, Ribera F, Lampert E, Bigard X, Serrurier B, Fortin D, Geny B, Veksler V, Ventura-Clapier R, and Mettauer B.** Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *J Physiol* 543: 191-200, 2002.
340. **Zungu M, Alcolea MP, Garcia-Palmer FJ, Young ME, and Essop MF.** Genomic modulation of mitochondrial respiratory genes in the hypertrophied heart reflects adaptive changes in mitochondrial and contractile function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H2819-2825, 2007.
341. **Zungu M, Young ME, Stanley WC, and Essop MF.** Chronic treatment with the peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist Wy-14,643 attenuates myocardial respiratory capacity and contractile function. *Mol Cell Biochem* 330: 55-62, 2009.
342. **Zungu M, Young ME, Stanley WC, and Essop MF.** Expression of mitochondrial regulatory genes parallels respiratory capacity and contractile function in a rat model of hypoxia-induced right ventricular hypertrophy. *Mol Cell Biochem* 318: 175-181, 2008.

**ANNEXES**

## ANNEXE 1

### Composition de l'excipient du GW 742

#### Préparation de la suspension de la molécule GW 610742 utilisée pour le gavage

Produit	Référence et fournisseur	Présentation	Lot utilisé
HPMC (hydroxypropyl)méthylcellulose	H-7509 – 25 g Sigma	Poudre (T ambiante)	078K0022
Méthylcellulose	M-6385 – 100 g Sigma	Solution (T ambiante)	127H1066
Tween 80	Réf : 2002 Euromedex	Solution (T ambiante)	040107
GW610742	GSK	Poudre (+4°C)	

Préparation de la solution aqueuse à 1% d'HPMC (M/V) + 1% Tween 80 (V/V) (V=10 mL) :

- pesée de 100 mg d'HPMC (produit très hygroscopique)
- pipeter 100 µL de Tween 80 : verser du Tween 80 dans un bécher, pipetage du produit : utiliser une P1000, couper le cône en biseau aux ciseaux
- mettre les 100 µL de Tween directement dans la cupule de pesée, sur la poudre d'HPMC.
- mélanger avec le cône de la pipette afin de « mouiller » toute la poudre avec le Tween 80, récupérer cette pâte visqueuse à l'aide d'une spatule de pesée.
- transvaser l'intégralité de la pâte à l'aide de la spatule dans un tube Falcon de 25 ou 50 mL
- ajouter progressivement l'H<sub>2</sub>O distillée (QSP pour 10 mL):
  - o 0,9 mL puis vortexer
  - o 1 mL puis vortexer, puis 2mL et vortexer, puis 3 mL et vortexer puis 3 mL et vortexer

## ANNEXE 2

### Intensités des entraînements en endurance au cours des cinq semaines

	Intensité Réelle m/min	Pente °	S1 70% VMA	S2	S3	S4 80 % VMA	S5
N O R M O X I E	7.8	10					
	11.4	10	2	2			
	14.4	10	3	3	2	2	2
	18.6	10	5	5	3	3	3
	21.6	10	5	5	5	5	5
	24.6	10	5	5	5	5	5
	25.5	10	25	40	5	5	5
30	10			40	55	60	
H Y P O X I E	4.8	10					
	7.8	10	2	2			
	10.2	10	3	3	1	1	1
	13.8	10	5	5	2	2	2
	15.6	10	5	5	3	3	3
	18.6	10	5	5	4	4	4
	20.4	10	25	40	5	5	5
23.4	10			5	5	5	
24.6	10			40	55	60	

## ANNEXE 3

### Composition des solutions de respiration mitochondriale

La solution S permet la diesssection des fibres et leur perméabilisation en présence de saponine (50 $\mu$ g/mL).

La solution R<sub>0</sub> correspond à la solution de respiration dépourvue de substrats.

	Solution S	Solution Ro
CaK <sub>2</sub> EGTA	2,77 mM	2,77 mM
K <sub>2</sub> EGTA	7,23 mM	7,23 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	-	3 mM
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	6,56 mM	1,38 mM
Na <sub>2</sub> ATP	5,7 mM	-
Créatine phosphate	15 mM	-
Imidazole	20 mM	20 mM
Taurine	20 mM	20 mM
Dithiothreitol (DTT)	0,5 mM	0,5 mM
Na Méthanesulfonate (Na-MES)	-	10 mM
K Méthanesulfonate (K-MES)	50 mM	90 mM
Albumine	-	2 mg.ml <sup>-1</sup>
	pH=7,1 à 22°C	pH=7,1 à 22°C
	Force ionique=160mM	Force ionique=160mM

## ANNEXE 4

## Séquences des primers

Gene	Primer probe	Sequence	Length (bp)	Gene Bank accession n°
Fat CD36	Forward	5'-GGCTTGAATCCTAACGAAGATGAGC -3'	117	NM-031561
	Reverse	5'- TCTAGCTGGCTTGACCAGTATGTTG -3'		
FABP-3	Forward	5'- ACAGCAGATGACAGGAAGGTCAAG -3'	106	NM-024162
	Reverse	5'- TTAGTTCCCGTGTAAGCGTAGTCTC -3'		
PDK-4	Forward	5'- ACAGGAAACCCAAGCCACATTG -3'	96	NM-053551
	Reverse	5'- ATCGCAGAGCATCTTGCACAC -3'		
CPT-1b	Forward	5'- CAAAGCAGTACCCCAATCATCTG -3'	94	NM-013200
	Reverse	5'- TTTTCGCCTGCGATCATGTAG -3'		
MCD	Forward	5'- TCCTCATAAAGCGAGTGGTCAAG -3'	102	NM-053477
	Reverse	5'- CCAGCAGCCACTTGGTGAATC -3'		
MCAD	Forward	5'- GCCCTGGACGAAGCTACTAAGTATG -3'	87	NM-016986
	Reverse	5'- GAGCAGAAATGAAACTCCTTGGTG -3'		
UCP-3	Forward	5'- TGTGCTGAGATGGTGACCTATGAC -3'	98	NM-013167
	Reverse	5'- CCAAAGGCAGAGACAAAGTGACAG -3'		
REDD-1	Forward	5'-TCCCTGGACAGCAGCAACAG-3'	120	NM-080906
	Reverse	5'- GTTGGCACACAGGTGCTCATC-3'		
PDK-1	Forward	5'- TGGTGGAAAAGGAAGTCCATCTC -3'	106	NM-053826
	Reverse	5'- AAGCCGTCTCGCATTCTCATAG -3'		
LDH-A	Forward	5'- GCACAAGCAGGTGGTTGACAGTG -3'	124	NM-017025
	Reverse	5'- ATGCACCCGCCTAAGGTTCTTC -3'		
PGC-1 $\alpha$	Forward	5'-ACGCAGGTCGAATGAAACTGAC -3'	116	NM-031347
	Reverse	5'-TGGTGGAAAGCAGGGTCAAAAATC -3'		
PPAR- $\alpha$	Forward	5'- TGGCAATGCACTGAACATCGAG -3'	112	NM-013196
	Reverse	5'- CCGAATAGTTCGCCGAAAGAAG -3'		

---

PPAR- $\delta$	Forward	5'- TCTGCAAGATCCAGAAGAAGAACC -3'	105	NM-013141
	Reverse	5'- GCATCCTTCCAAAGCGGATAG -3'		
MUSCLINE	Forward	5'- GCATTCTCCGTGGACTTAGCATC -3'	124	NM-198112.1
	Reverse	5'- CATCAAGAAGCAGGAGCTTAGCTG -3'		

## ANNEXE 5

### Tampon d'extraction pour le dosage de l'activité citrate synthase et 3-HAD

Produit	Poids Moléculaire	[C] finale
HEPES	238,3	5 mM
EGTA	380,4	1 mM
Triton X 100	Pur	0,10 %
DTT (extemporanément)	154,2	1 mM

*Composition du tampon d'extraction : conservation à +4°C pendant plusieurs mois.*

\* DTT : préparer la solution mère à 1 M et la rajouter extemporanément le jour de l'extraction : ne pas stocker le tampon avec le DTT.

Mise à pH : 8,7 à +30°C

### Tampon d'extraction pour le dosage de l'activité 3-HAD

Produit	Poids Moléculaire	[C] finale
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136	300 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	228	300 mM
Albumine		0,5g/100mL

Milieu réactionnel :

Produit	Poids Moléculaire	[C] finale
Aceto-acetyl CoA	971,6	5 mM
NADH	709,4	23 mM
Imidazole	68,1	40 mM
EDTA	-	200 mM