



HAL
open science

Contribution à l'étude des effets de l'activité physique sur le fonctionnement mitochondrial et la production de radicaux libres - Etude sur mitochondries musculaires et hépatiques

Tom Coisne

► To cite this version:

Tom Coisne. Contribution à l'étude des effets de l'activité physique sur le fonctionnement mitochondrial et la production de radicaux libres - Etude sur mitochondries musculaires et hépatiques. Physiologie [q-bio.TO]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00626716

HAL Id: tel-00626716

<https://theses.hal.science/tel-00626716>

Submitted on 26 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 Joseph Fourier - Grenoble 1

Année 2007

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR de L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Présentée et soutenue publiquement le 21 décembre 2007

par

Tom COISNE

*Contribution à l'étude des effets de l'activité physique sur le
fonctionnement mitochondrial et la production de radicaux libres*

- Etude sur mitochondries musculaires et hépatiques

Directeurs de thèse : Pr. Xavier Leverve
Dr. Hervé Dubouchaud

JURY

Pr. Irène Margaritis	<i>Paris France</i>	Examineur
Dr. Damien Freyssenet	<i>St-Etienne France</i>	Rapporteur
Pr. Jacques Mercier	<i>Montpellier France</i>	Rapporteur
Dr. Hervé Dubouchaud	<i>Grenoble France</i>	Directeur
Pr. Xavier Leverve	<i>Grenoble France</i>	Directeur

SOMMAIRE

SOMMAIRE	3
LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX	7
ABREVIATIONS	11
AVANT PROPOS	13
REVUE DE LITTÉRATURE	15
1 Stress oxydant : quand l'oxygène devient toxique !	16
1.1 Le stress : définition physiologique	16
1.2 Le stress oxydant : une histoire d'équilibre redox	16
1.2.1 Historique.....	17
1.2.2 Les différentes espèces radicalaires de l'oxygène.....	18
1.2.3 Les systèmes antioxydants	20
1.2.3.1 Systèmes non enzymatiques.....	20
1.2.3.2 Systèmes enzymatiques.....	20
1.2.4 Les dommages oxydants	21
1.2.4.1 Peroxydation lipidique.....	22
1.2.4.2 Oxydation des protéines.....	22
1.2.4.3 Oxydations de l'ADN.....	23
1.2.5 Intérêt physiologique des oxydants.....	23
1.2.5.1 Mécanismes moléculaires de signalisation radicalaire.....	24
1.2.5.2 Cibles redox-sensibles dans les cascades de signalisation	26
1.2.6 Implication des ROS dans les pathologies.....	28
1.2.7 Les différents sites de production	29
2 Stress oxydant : quand l'oxydation phosphorylante mitochondriale devient une source radicalaire	31
2.1 La mitochondrie : généralités	31
2.2 Organisation de la chaîne respiratoire mitochondriale et de l'ATP synthase	33
2.2.1 La chaîne respiratoire et ses constituants : « fluid-state model ».....	34
2.2.1.1 Le complexe I (ou NADH-ubiquinone oxydo-réductase).....	35
2.2.1.2 Le complexe II (ou succinate-ubiquinone oxydo-réductase).....	35
2.2.1.3 L'ETF-QO (ou electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase).....	36
2.2.1.4 Le complexe III (ou complexe bc ₁ ; ubiquinol-cytochrome c réductase).....	36
2.2.1.5 Le complexe IV (ou cytochrome oxydase)	37
2.2.1.6 ATP synthase (Complexe F ₀ -F ₁).....	37
2.2.2 Les supercomplexes « respirasome ».....	40
2.3 Contrôle de la respiration mitochondriale	41
2.3.1 Contrôle par l'apport de substrats	41
2.3.1.1 Glutamate / Malate.....	42
2.3.1.2 Succinate.....	43
2.3.1.3 Acides gras.....	43
2.3.2 Contrôle par l'utilisation d'inhibiteurs.....	44
2.3.2.1 Complexe I : Roténone, Barbituriques, Meperidine.....	44
2.3.2.2 Complexe II : Malonate, Thényltrifluoroacétone (TTFA)	45
2.3.2.3 Complexe III : Antimycine A, Myxothiazol, Dimercaprol	45
2.3.2.4 Complexe IV : Cyanure, Oxyde de carbone.....	46
2.3.2.5 Complexe F ₀ -F ₁ : Oligomycine, Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD).....	46
2.4 Modifications du rendement de l'oxydation phosphorylante	47
2.4.1 Perméabilité membranaire aux protons : Leak.....	47
2.4.2 Patinage des pompes à protons : Slipping.....	48
2.4.3 Nature des équivalents réduits	49
2.4.4 Stress oxydant	50
2.5 Sites de production de ROS de la chaîne respiratoire mitochondriale	51

2.5.1	Le complexe I.....	51
2.5.2	Le complexe III.....	53
2.6	Contrôle de la production mitochondriale de ROS.....	54
2.6.1	Contrôle par l'apport de substrats.....	54
2.6.2	Contrôle par l'utilisation d'inhibiteurs.....	55
3	<i>Stress oxydant et activité physique : quand l'activité de la chaîne respiratoire s'accélère.....</i>	56
3.1	Stress oxydant et fonctionnement musculaire à l'exercice.....	56
3.1.1	Les bases de l'étude du stress oxydant à l'exercice.....	56
3.1.2	Réponse musculaire à l'exercice unique.....	58
3.1.2.1	Dommages et défenses musculaires et l'exercice unique.....	58
3.1.2.2	Production radicalaire musculaire et exercice unique.....	59
3.1.3	Réponse musculaire et activité physique chronique.....	63
3.1.3.1	Dommages et défenses musculaires et exercice chronique.....	63
3.1.3.2	Production radicalaire de mitochondries musculaires et exercice chronique.....	64
3.2	Stress oxydant et fonctionnement hépatique à l'exercice.....	66
3.2.1	Rôle du foie dans le métabolisme.....	66
3.2.2	Exercice et fonctionnement hépatique.....	66
3.2.3	Dommages et défenses hépatiques et exercice chronique.....	67
3.2.4	Production radicalaire hépatiques et exercice.....	69
3.3	Activités physiques et biogenèse mitochondriale.....	73
3.3.1	Préambule.....	73
3.3.2	Activité physique chronique et biogenèse mitochondriale.....	74
3.3.3	Hypothèses de régulation de la biogenèse.....	75
3.3.3.1	Hypothèse calcique.....	75
3.3.3.2	Hypothèse des rapports énergétiques : ATP/ADP/AMP.....	76
3.3.3.3	Hypothèse radicalaire.....	77
3.3.4	Rôle du coactivateur transcriptionnel PGC-1 α	78
	<i>HYPOTHESES ET OBJECTIFS SCIENTIFIQUES.....</i>	80
	<i>MATERIEL ET METHODES.....</i>	82
1	<i>Traitement des animaux.....</i>	83
1.1	Groupes expérimentaux.....	83
1.1.1	Protocole d'exercice sur tapis roulant.....	84
1.1.1.1	Exercice unique.....	84
1.1.1.2	Exercice chronique.....	84
1.1.2	Traitement aux oligonucléotides antisens PGC-1 α (PGC-1 α /AS).....	85
1.1.2.1	Principe.....	85
1.1.2.2	Protocole expérimental.....	85
2	<i>Préparation du matériel biologique.....</i>	86
2.1	Prélèvement tissulaire.....	86
2.2	Préparation des mitochondries isolées.....	86
2.2.1	Principe.....	86
2.2.2	Protocole expérimental.....	86
2.2.2.1	Isolement des mitochondries de foie.....	86
2.2.2.2	Isolement des mitochondries de muscle.....	87
2.3	Détermination des concentrations protéiques.....	87
2.3.1	Principe.....	87
2.3.2	Protocole expérimental.....	88
3	<i>Techniques d'études et de mesures utilisées sur mitochondries isolées.....</i>	88
3.1	Oxygraphie.....	88
3.1.1	Principe.....	88
3.1.2	Protocole expérimental.....	89

3.2	Fluorimétrie : Mesure de la production de ROS	91
3.2.1	Principes.....	91
3.2.1.1	Principe de fluorescence	91
3.2.1.2	Principe de mesure avec la sonde artificielle : Amplex Red	92
3.2.2	Protocole expérimental.....	93
3.3	Mesure des activités enzymatiques	95
3.3.1	Mesures d'activité des complexes de la chaîne respiratoire	95
3.3.1.1	Principe.....	95
3.3.1.2	Protocole expérimental	95
3.3.2	Mesure de la cytochrome oxydase par oxygraphie	97
3.3.2.1	Principe.....	97
3.3.2.2	Protocole expérimental	98
3.3.3	Dosage de la citrate synthase	98
3.3.3.1	Principe.....	98
3.3.3.2	Protocole expérimental	99
3.4	Expressions protéiques	99
3.4.1	Préparation des échantillons.....	99
3.4.2	Electrophorèse sur gel SDS-PAGE	100
3.4.2.1	Principe.....	100
3.4.2.2	Protocole expérimental	101
3.4.3	Transfert sur membrane PVDF	102
3.4.3.1	Principe.....	102
3.4.3.2	Protocole expérimental	103
3.4.4	Saturation ou blocage.....	104
3.4.4.1	Principe.....	104
3.4.4.2	Protocole expérimental	105
3.4.5	Détection par immuno-marquage.....	105
3.4.5.1	Principe.....	105
3.4.5.2	Protocole expérimental	105
3.4.6	Révélation par chimiluminescence.....	106
3.4.6.1	Principe.....	106
3.4.6.2	Protocole expérimental	107
3.4.7	Analyse densitométrique.....	108
3.5	Mesure du stress oxydant	109
3.5.1	Préparation des homogénats.....	109
3.5.2	Péroxydation des lipides par mesure des TBARS.....	109
3.5.2.1	Principe.....	109
3.5.2.2	Protocole expérimental	110
3.5.3	Oxydation des protéines par mesure des thiols	110
3.5.3.1	Principe.....	110
3.5.3.2	Protocole expérimental	111
3.5.4	Glutathion.....	111
3.5.4.1	Principe.....	111
3.5.4.2	Protocole expérimental	112
3.6	Mesure des défenses antioxydantes	112
3.6.1	Activité Glutathion peroxydase (GPX)	112
3.6.1.1	Principe.....	112
3.6.1.2	Protocole expérimental	112
3.6.2	Activité Superoxyde dismutase (SOD)	113
3.6.2.1	Principe.....	113
3.6.2.2	Protocole expérimental	113
3.7	Statistiques	114
RESULTATS ET DISCUSSIONS.....		115
1	Mise au point expérimentale	116
1.1	Mesure de la consommation d'oxygène.....	116
1.2	Mesure de la production radicalaire.....	117
2	Modifications de l'activité mitochondriale induites par l'exercice unique	120
2.1	Consommation d'oxygène et exercice unique.	120

2.1.1	Consommation d'oxygène des mitochondries musculaires	120
2.1.1.1	Effets du substrat sur la consommation d'oxygène de mitochondries musculaires	120
2.1.1.2	Effets du délai post-exercice sur la consommation d'oxygène de mitochondries musculaires	121
2.1.2	Consommation d'oxygène des mitochondries hépatiques	122
2.1.2.1	Effets du substrat sur la consommation d'oxygène de mitochondries hépatiques	122
2.1.2.2	Effets du délai post-exercice sur la consommation d'oxygène de mitochondries hépatiques	123
2.2	Production radicalaire et exercice unique.....	124
2.2.1	Production radicalaire des mitochondries musculaires	124
2.2.1.1	Effets du substrat sur la production d'H ₂ O ₂ de mitochondries musculaires	124
2.2.1.2	Effets du délai post exercice sur la production d'H ₂ O ₂ de mitochondries musculaires	125
2.2.2	Production radicalaire des mitochondries hépatiques	127
2.2.2.1	Effets du substrat sur la production d'H ₂ O ₂ de mitochondries hépatiques	128
2.2.2.2	Effets du délai post exercice sur la production d'H ₂ O ₂ de mitochondries hépatiques	128
2.3	Rapport H₂O₂/JO₂	129
2.4	Défenses antioxydantes, activité cytochrome oxydase et exercice unique	130
2.5	Discussion	131
3	<i>Modifications de l'activité mitochondriale induites par l'activité physique chronique.</i>	139
3.1	Résultats préliminaires : validation du protocole d'entraînement	139
3.1.1	Evolution pondérale	140
3.1.2	Evolution de la prise alimentaire.....	141
3.1.3	Evolution de l'activité citrate synthase	142
3.1.4	Discussion intermédiaire.....	143
3.2	Consommation d'oxygène et activité physique chronique.....	145
3.2.1	Consommation d'oxygène des mitochondries musculaires	145
3.2.2	Consommation d'oxygène des mitochondries hépatiques	147
3.3	Production radicalaire et activité physique chronique	149
3.3.1	Production radicalaire des mitochondries musculaires	149
3.3.2	Production radicalaire des mitochondries hépatiques	150
3.4	Stress oxydant et activité physique chronique	152
3.5	Activités enzymatiques et activité physique chronique.....	154
3.6	Expression protéique et activité physique chronique.....	155
3.7	Discussion	155
4	<i>Effet de l'administration de PGC-1α/AS sur le fonctionnement mitochondrial.....</i>	161
4.1	Effet général du traitement à l'oligo antisens de PGC-1α	161
4.1.1	Validation du traitement intra-péritonéal PGC-1 α /AS	161
4.1.2	Rôle de PGC-1 α dans la biogenèse mitochondriale	162
4.1.3	Discussion intermédiaire.....	163
4.2	Fonctionnement mitochondrial et traitement PGC-1α/AS.....	165
4.2.1	Consommation d'oxygène et traitement PGC-1 α /AS	165
4.2.1.1	PGC-1 α /AS et consommation d'oxygène de mitochondries musculaires	165
4.2.1.2	PGC-1 α /AS et consommation d'oxygène de mitochondries hépatiques	167
4.2.2	Production radicalaire et traitement PGC-1 α /AS	169
4.2.2.1	PGC-1 α /AS et production d'H ₂ O ₂ de mitochondries musculaires	169
4.2.2.2	PGC-1 α /AS et production d'H ₂ O ₂ de mitochondries hépatiques	171
4.2.3	Rapport ROS/JO ₂ et traitement PGC-1 α /AS	172
4.2.4	Contenu protéique mitochondrial et traitement PGC-1 α /AS	173
4.3	Discussion	173
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....		178
BIBLIOGRAPHIE.....		183
COMMUNICATIONS.....		195
ANNEXE.....		196

LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX

REVUE DE LITTERATURE

Figure 1 : Illustration de la balance redox entre prooxydants et antioxydants.....	17
Figure 2: Mitochondries observées par microscopie optique et électronique.....	31
Figure 3: Structure et compartiments mitochondriaux avec leurs principaux constituants	32
Figure 4: Représentation linéaire de la chaîne respiratoire mitochondriale et de l'ATP synthase	34
Figure 5 : Structure du complexe I.....	35
Figure 6 : Structure du complexe II.....	35
Figure 7 : Structure de l'ETF-QO.....	36
Figure 8 : Structure du complexe III.....	36
Figure 9 : Structure du complexe IV.....	37
Figure 10 : Structure du complexe F ₀ -F ₁	37
Figure 11: Les différents états de respiration	39
Figure 12 : Schéma illustratif de l'arrangement mitochondrial des supercomplexes.	40
Figure 13 : Schéma du transport du glutamate/malate du cytosol à l'espace matriciel.	42
Figure 14 : Schéma du transport des acides gras du cytosol à l'espace matriciel.....	43
Figure 15 : Phénomène de proton leak	48
Figure 16 : Phénomène de redox slipping.	48
Figure 17 : Phénomène de proton slipping.....	49
Figure 18 : Sites hypothétiques de production d'O ₂ ⁻ par le complexe I.....	52
Figure 19 : Sites de production d'O ₂ ⁻ par le complexe III.....	53
Figure 20 : Illustration du signal de radicaux libres observé par EPR dans des homogénats de muscle de rats au repos et à la suite d'un exercice exhaustif d'endurance sur tapis roulant.....	60
Figure 21: Activation du facteur de transcription NF-κB sur extrait nucléaire de muscle gastrocnémien de rats au repos ou à 0h, 1h, 2h, 4h, 24h, 48h après un exercice exhaustif (~ 60 min, 25 m/min, pente 5%) sur tapis roulant.	62
Figure 22 : Figure typique de la théorie d'Hormesis et des effets de l'exercice.....	73
Figure 23 : Illustration de la biogenèse mitochondriale musculaire induite par l'entraînement.....	74
Figure 24 : Schéma d'activation de l'AMPK par l'AMP en réponse à la contraction musculaire.	76
Figure 25 : Schéma d'induction de la biogenèse mitochondriale au niveau musculaire via PGC-1α.	78
Tableau 1: Les différentes espèces actives dérivées de l'oxygène moléculaire, leurs caractéristiques, demi-vie et concentrations <i>in vivo</i>	19
Tableau 2 : Activités enzymatiques de la SOD et de la GPx et niveau de TBARS.....	59
Tableau 3 : Tableau de synthèse des effets de l'exercice chronique sur le stress oxydant observés ces 10 dernières années.	71
Tableau 4 : Tableau de synthèse des effets de l'exercice aigu sur le stress oxydant observés ces 10 dernières années.....	72

MATERIEL ET METHODES

Figure 26 : Tapis roulant pour rongeurs.....	84
Figure 27 : Schéma de principe de l'électrode de Clark (Hansatech Electrode S1).....	89
Figure 28 : Chambre d'oxygraphie ajustable. Hansatech Instruments.....	89
Figure 29 : Représentation schématique des différents états respiratoires en fonction de l'addition des substrats ou inhibiteurs.....	90
Figure 30: Représentation schématique du principe de fluorescence.....	92
Figure 31 : Equation d'oxydation de l'Amplex Red par l' H_2O_2	93
Figure 32 : Représentation schématique de la mesure de production de ROS par fluorimétrie en fonction de l'addition des substrats ou inhibiteurs.....	94
Figure 33 : Principe réactionnel du dosage d'activité du complexe I.....	95
Figure 34 : Principe réactionnel du dosage d'activité du complexe II.....	96
Figure 35 : Principe réactionnel du dosage d'activité du complexe IV.....	97
Figure 36 : Principe réactionnel du dosage d'activité de la citrate synthase.....	98
Figure 37 : Schéma explicatif du montage du support de plaque pour gel d'électrophorèse.....	102
Figure 38 : Schéma de montage du « sandwich » de transfert.....	103
Figure 39 : Schéma illustratif de l'étape de blocage.....	104
Figure 40 : Schéma illustratif de la fixation de l'anticorps primaire.....	106
Figure 41 : Schéma illustratif de la fixation de l'anticorps secondaire conjugué.....	106
Figure 42 : Principe réactionnel du dosage des TBARS.....	110
Figure 43 : Principe réactionnel du dosage des Thiols.....	111
Figure 44 : Equation réactionnel du principe de dosage du glutathion.....	111
Figure 45 : Principe réactionnel du dosage de la GPX.....	112
Figure 46 : Principe réactionnel du dosage de la SOD.....	113
Tableau 5 : Composition des groupes expérimentaux : rats Wistar.....	83
Tableau 6 : Concentrations des substrats et inhibiteurs utilisés sur mitochondries isolées en oxygraphie.....	91
Tableau 7 : Concentrations des substrats et inhibiteurs utilisés sur mitochondries isolées en fluorimétrie pour la mesure de la production de ROS.....	94
Tableau 8: Solutions et volumes utilisés pour préparer les gels de poly-acrylamide.....	101
Tableau 9 : Tableau de synthèse de la détection protéique par Western Blot.....	107

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Figure 47 : Effet de l'entraînement en endurance sur l'évolution de la masse corporelle (g) de rats.....	140
Figure 48 : Effet de l'entraînement en endurance sur la prise alimentaire (g/100g de poids de corps) de rats... ..	141
Figure 49 : Effet d'un entraînement en endurance sur l'activité de la citrate synthase (CS) de tissus musculaires et hépatique.....	142
Figure 50 : Effets d'un entraînement en endurance sur l'activité de la glutathion peroxydase (A) et de la superoxyde dismutase (B) du foie de rats contrôles ou entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min.....	153

Figure 51 : Effet d'un entraînement en endurance sur le contenu protéique en complexes V, III, IV, II et I de la chaîne respiratoire mitochondriale mesuré sur mitochondries musculaires de rats contrôles ou entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min.	155
Figure 52 : Effet du traitement anti-PGC-1 α sur le contenu protéique en PGC-1 α de muscle de rats contrôles et traités à l'antisens de PGC-1 α	161
Figure 53 : Effet du traitement anti-PGC-1 α sur l'activité citrate synthase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéine tissulaire) mesuré sur homogénats musculaires et hépatiques, de rats contrôles, entraînés 6 semaines (Entraînement), entraînés et traités aux oligonucléotides antisens de PGC-1 α pendant 6 semaines (Entraînement + PGC-1 α /AS) et traités aux oligonucléotides antisens de PGC-1 α pendant 6 semaines (PGC-1 α /AS).....	162
Figure 54 : Effet d'un entraînement en endurance sur le contenu protéique en complexes V, III, IV, II et I de la chaîne respiratoire mitochondriale mesuré sur mitochondries musculaires de rats entraînés et traités à l'antisens de PGC-1 α et de rats traités à l'antisens de PGC-1 α uniquement.	173
Tableau 10: Effet du délai post-exercice sur la consommation d'oxygène (nmol d'O/min/mg prot), le contrôle respiratoire (RCR) et l'activité de la cytochrome oxydase (TMPD/Asc+DNP) de mitochondries de muscle provenant de rats contrôles, exercés pendant 60 min et sacrifiés dès la fin de l'exercice (Exercice t ^{0h}) ou exercés pendant 60 min et sacrifiés 2h après la fin de cet exercice (Exercice t ^{+2h}).....	121
Tableau 11 : Effet du délai post-exercice sur la consommation d'oxygène (nmol d'O/min/mg prot), le contrôle respiratoire (RCR) et l'activité de la cytochrome oxydase (TMPD/Asc+DNP) de mitochondries de foie provenant de rats contrôles, exercés pendant 60 min et sacrifiés dès la fin de l'exercice (Exercice t ^{0h}) ou exercés pendant 60 min et sacrifiés 2h après la fin de cet exercice (Exercice t ^{+2h})	123
Tableau 12 : Effet du délai post-exercice sur la production de peroxyde d'hydrogène (pmol d'H ₂ O ₂ /min/mg prot) de mitochondries de muscle provenant de rats contrôles, exercés pendant 60 min et sacrifiés dès la fin de l'exercice (Exercice t ^{0h}) ou exercés pendant 60 min et sacrifiés 2h après la fin de cet exercice (Exercice t ^{+2h}).....	124
Tableau 13 : Effet du délai post-exercice sur la production de peroxyde d'hydrogène (pmol d'H ₂ O ₂ /min/mg prot) de mitochondries de foie provenant de rats contrôles, exercés pendant 60 min et sacrifiés dès la fin de l'exercice (Exercice t ^{0h}) ou exercés pendant 60 min et sacrifiés 2h après la fin de cet exercice (Exercice t ^{+2h}).....	127
Tableau 14 : Effet du délai post-exercice sur le rapport entre la production de peroxyde d'hydrogène (pmol d'H ₂ O ₂ /min/mg prot) et la consommation d'oxygène (nmol d'O/min/mg prot) à l'état 2 de mitochondries de foie et de muscle provenant de rats contrôles, exercés pendant 60 min et sacrifiés dès la fin de l'exercice (Exercice t ^{0h}) ou sacrifiés 2h après la fin de cet exercice (Exercice t ^{+2h}).....	129
Tableau 15 : Effet du délai post-exercice sur le rapport entre la production de peroxyde d'hydrogène (pmol d'H ₂ O ₂ /min/mg prot) et la consommation d'oxygène (nmol d'O/min/mg prot) à l'état 3 de mitochondries de foie et de muscle provenant de rats contrôles, exercés pendant 60 min et sacrifiés dès la fin de l'exercice (Exercice t ^{0h}) ou sacrifiés 2h après la fin de cet exercice (Exercice t ^{+2h}).....	129
Tableau 16: Activité du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale de muscle squelettique et de foie de rats contrôles, exercés pendant 60 min et sacrifiés dès la fin de l'exercice (Exercice t ^{0h}) et sacrifiés 2h après la fin de cet exercice (Exercice t ^{+2h}).....	130
Tableau 17 : Effet d'un entraînement en endurance sur la consommation d'oxygène (nmol d'O/min/mg prot), le contrôle respiratoire (RCR) et l'activité de la cytochrome oxydase (TMPD/Asc+DNP) de mitochondries de muscle provenant de rats contrôles ou entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min.	145
Tableau 18 : Effet d'un entraînement en endurance sur la consommation d'oxygène (nmol d'O/min/mg prot), le contrôle respiratoire (RCR) et l'activité de la cytochrome oxydase (TMPD/Asc+DNP) de mitochondries de foie provenant de rats contrôles ou entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min.	147
Tableau 19 : Effet d'un entraînement en endurance sur la production de peroxyde d'hydrogène (pmol d'H ₂ O ₂ /min/mg de protéines) de mitochondries de muscle provenant de rats contrôles ou entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min.....	149

Tableau 20 : Effet d'un entraînement en endurance sur la production de peroxyde d'hydrogène (pmol d'H ₂ O ₂ /min/mg de protéines) de mitochondries de foie provenant de rats contrôles ou entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min.	150
Tableau 21 : Effet d'un entraînement en endurance sur le rapport entre la production de peroxyde d'hydrogène (pmol d'H ₂ O ₂ /min/mg prot) et la consommation d'oxygène (nmol d'O/min/mg prot) à l'état 2 de mitochondries de foie et de muscle provenant de rats contrôles ou entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min.....	151
Tableau 22 : Effet de l'entraînement en endurance sur la peroxydation lipidique (TBARS), l'oxydation protéique (Thiols) et l'activité du Statut Antioxydant Mitochondrial Totale dans le foie et le muscle de rats contrôles ou entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min.	152
Tableau 23 : Effet de l'entraînement en endurance sur les activités de citrate synthase tissulaire et mitochondriale et sur l'activité mitochondriales des complexes I, II et IV extrait de foie et muscle de rats contrôles ou entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min.	154
Tableau 24 : Effet d'un entraînement en endurance sur la consommation d'oxygène (nmol d'O/min/mg prot), le contrôle respiratoire (RCR) et l'activité de la cytochrome oxydase (TMPD/Asc+DNP) de mitochondries de muscle provenant de rats entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min, de rats entraînés et traités à l'antisens de PGC-1 α et de rats traités à l'antisens de PGC-1 α uniquement.	165
Tableau 25 : Effet d'un entraînement en endurance sur la consommation d'oxygène (nmol d'O/min/mg prot), le contrôle respiratoire (RCR) et l'activité de la cytochrome oxydase (TMPD/Asc+DNP) de mitochondries de foie provenant de rats entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min, de rats entraînés et traités à l'antisens de PGC-1 α et de rats traités à l'antisens de PGC-1 α uniquement.....	167
Tableau 26 : Effet d'un entraînement en endurance sur la production de peroxyde d'hydrogène (pmol d'H ₂ O ₂ /min/mg de protéines) de mitochondries de muscle provenant de rats contrôles ou entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min.....	169
Tableau 27 : Effet d'un entraînement en endurance sur la production de peroxyde d'hydrogène (pmol d'H ₂ O ₂ /min/mg de protéines) de mitochondries de muscle provenant de rats contrôles ou entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min.....	171
Tableau 28 : Effet d'un entraînement en endurance sur le rapport entre la production de peroxyde d'hydrogène (pmol d'H ₂ O ₂ /min/mg prot) et la consommation d'oxygène (nmol d'O/min/mg prot) à l'état 2 de mitochondries de foie et de muscle provenant de rats entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min, de rats entraînés et traités à l'antisens de PGC-1 α et de rats traités à l'antisens de PGC-1 α uniquement.	172

ABREVIATIONS

-A-

AA Acétoacétate ou antimycine A
Acétyl CoA Acétyl coenzyme A
ADN Acide désoxyribonucléique
ADNc ADN cyclique
ADNmt ADN mitochondrial
ADNn ADN nucléaire
ADP Adénosine diphosphate
AICAR analogue de l'adénosine5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside
AMPK AMP-activated protéine kinase
AmplexA Red 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine
ANOVA analyse de variance
ANT transporteur des nucléotides adényliques
AP-1 Activator Protein 1
APS persulfate d'ammonium
ARN Acide ribonucléique
ARNm ARN messenger
ARNr ARN ribosomal
ARNt ARN de transfert
Asc Ascorbate
ATP Adénosine triphosphate
ATPase F₀F₁ ATP synthase

-B-

BCA Acid bicinchoninique
BSA Bovin Serum Albumin, albumine sérique bovine
BSA-FFA BSA free fatty acid, sans acide gras

-C-

C16 acide palmitique
Ca²⁺ ion calcium
CACT carnitine/acylcarnitine translocase
CaMK Ca²⁺ calmoduline dépendante
CAT catalase
c-jun /c-fos protéines régulatrices de gènes
COX Cytochrome Oxydase
CPT-I carnitine-palmitoyltransférase-I
CPT-II carnitine palmitoyltransférase-II
CS citrate synthase
CsA cyclosporine A
Cu⁺ cation cuivre
Cu²⁺ Cuivre
Cys-SH résidu cystéine à l'état réduit

Cys-SOH un groupe sulfénique
HDL High Density lipoprotein

-D-

DCCD Dicyclohexylcarbodiimide
DCFH-DA 2-7 dichlorofluorescein diacetate

DCIP 2,6-dichloroindophénol
DHBA acide salicylique ou 2,3-dihydroxybenzoïc acid
DNP Dinitrophénol, découplant protonophore
DO densité optique
DTNB 5-5'-DiThiobis(2-acide NitroBenzoïque)
DTPA Acide Diéthylène TriaminePenta l'acide dinitrothiobenzoïque

-E,F-

EDL extenseur longs des doigts
EDTA Acide éthylène diamine tétra-acétique
ETF-QO Electron Transfert Flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase
ETF²⁻ forme semiquinone de l'ETF
FAD⁺/FADH₂ Flavine adénine dinucléotide oxydée/réduite
Fe-S groupement fer/soufre
Fe²⁺ fer ferreux
Fe³⁺ fer ferrique
FMN flavines mononucléotides

-G,H-

G/M glutamate/malate
G/M/S Glutamate/Malate/Succinate
GPX/GSH/GSSG glutathion peroxydase/ réduit/oxydé
GR Glutathion Reductase
H⁺ Proton
H₂O₂ peroxyde d'hydrogène
HClO₄ acide perchlorique
HIF-1 Hypoxia inducible factor
HPGPx hydroperoxyde-glutathion peroxydase
HRP horseradish peroxidase, la peroxydase de raifort
HVA acide homovanilique

-I,J-

IgG immunoglobulines G
IGF-1 insulin-like Growth Factor
IRP Iron Regulatory Protein
J_{ATP}/J_O ou P/O flux d'ATP et d'oxygène
JNK Jun kinases
JO₂ Flux d'oxygène

-K-

KCl chlorure de potassium
kDa kilodalton
KH₂PO₄ Dihydrogénophosphate de potassium
K₂HPO₄ Hydrogénophosphate de potassium

-M-

MAPK Mitogen Activated Protein Kinase
MAPR Mitochondrial ATP Production Rate, le taux de production d'ATP mitochondrial

MDA malondialdéhyde
MDA-(TBA)₂ pigment rose
MgCl₂ Chlorure de magnésium
MOPS acide 3 (N-morpholino)-propane sulfonique
MPA Acide MétaPhosphorique
mTFA ou Tfam facteur de transcription mitochondrial A

-N-

NAC N-Acétyl-cystéine
NaCl Chlorure de sodium
NAD⁺/ NADH nicotinamide adénine dinucléotide oxydé/ réduite
NADPH nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NF-κB facteur de transcription
NFAT nuclear factor of activated T cells
NO monoxyde d'azote
NRF-1, NRF-2 facteurs respiratoires nucléaires
NS non significatif statistiquement ($P < 0,05$)

-O,P-

O₂ Oxygène moléculaire
O₂^{o-} anion superoxyde
OH⁻ Radical hydroxyle
OXPPOS oxydation phosphorylante
p38, p53 serine/threonine-specific protéine kinase
PC palmitoyl-L-carnitine
PGC-1α/AS Peroxisome proliferator activate receptor λ coactivator -1α/anti sens
PHD Prolyl Hydroxylase
Pi Phosphate inorganique
pKa constante de dissociation acide
PKC protéine kinase C
PMSF acide PhenylMethylSulFonyl
PPAR Peroxysome Proliferation Activated Receptor
PVDF Polyvinylidene difluoride

-Q,R-

Q quinone
Q10 ubiquinone
QH⁻ ubisemiquinone
QH₂ ubiquinol
RCR Rapport de Contrôle Respiratoire
Ref-1 Redox factor 1
RES résonance électronique de spin ou EPR electron paramagnetic resonance
RNS Reactive Nitrogen Species
ROOH radical hydroxyle
ROS Reactive oxygen species, espèces réactives de l'oxygène
ROT Roténone
RT PCR Real Time Polymerase Chain Reaction ou Amplification en Chaîne par Polymérisation

-S-

SDS-PAGE Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SDS Sodium Dodécyl Sulfate
SEM erreur standard à la moyenne
Sfc1p succinate-fumarate transporteur
SH groupement sulfhydryle
SIDA syndrome d'immunodéficience acquise
SOD Cu/Zn Superoxyde dismutase cytosolique à cofacteur cuivre/zinc
SOD Mn Superoxyde dismutase mitochondriale à cofacteur manganèse
SO-H acide sulfénique

-T-

TBA acide thiobarbiturique
TBARS Thiobarbituric Acid Reactive Species, espèce réactive de l'acide thiobarbiturique
TBS Tris Buffer Saline
TEMED NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine
TEP 1,1,3,3 tétraéthoxypropane
TEP 1,1,3,3 tétraéthoxypropane facteur de transcription mitochondrial
TMPD N,N,N',N'-tétraméthyl-p-phénylènediamine
TNB 5-Thio-2-NitroBenzoate
TOM translocon of the outer membrane
TIM translocon of the inner membrane
TTEA Thénoyltrifluoroacétone
Tween[®]20 polyéthylène sorbitan monolaurate

-U,V,Z-

UCP Uncoupling Protein ou protéine découplante
UV rayonnement solaire ultra-violet
VDAC Voltage Dependent Anion Chanel
VO_{2max} Consommation maximale d'oxygène
Zn Zinc

γ-GCS γ-glutamylcysteine synthetase
[R^o] Concentration en donneurs d'électrons (sites réduits).
¹**O₂** Oxygène singulet
4-HNE 4-hydroxynonanal
8-OhdG 8-hydroxy déoxyguanosine
ΔΨ potentiel de membrane mitochondrial
Δp force protomotrice
ΔpH gradient de pH

AVANT PROPOS

« J'ai dit que l'exercice même violent, contribue à l'accroissement du corps. En doutez-vous ? »

F.C BÉLOT (Paris, 1745)

« ... si l'on décompose l'organisme vivant en isolant ses diverses parties, ce n'est que pour la facilité de l'analyse expérimentale, et non point pour les concevoir séparément. En effet, quand on veut donner à une propriété physiologique sa valeur et sa véritable signification, il faut toujours la rapporter à l'ensemble et ne tirer de conclusion définitive que relativement à ses effets dans cet ensemble. »

Claude Bernard (1865)

Que ce soit au repos ou au cours d'une activité physique, au moins 98% de l'oxygène que nous respirons est destiné à être utilisé par nos mitochondries. Cet oxygène est acheminé vers cet organite dans le but de produire par phosphorylation oxydative, une forme d'énergie cellulaire indispensable au bon fonctionnement de l'organisme : l'ATP. Au cours de l'activité physique, la demande énergétique s'accroît de façon exponentielle pour assurer la contraction musculaire et le maintien de l'homéostasie. Nous comprendrons alors facilement pourquoi à l'exercice, la respiration mitochondriale s'accélère et prend une place majeure dans la fourniture énergétique.

Les premières études ayant associé l'activité physique et l'évolution du contenu mitochondrial remontent aux années 1970 (Hollloszy, 1967). Il ressortit alors que l'activité physique, forte consommatrice d'énergie, favorise par phénomènes d'adaptations la multiplication mitochondriale. Un peu plus tard, au début des années 80, une étude montra que l'augmentation d'activité mitochondriale à l'exercice était la source d'une production massive de radicaux libres (Davies et coll., 1982). Ces derniers étant connus pour être associés à de nombreux états pathologiques (Droge, 2002), il fut alors légitime de se poser la question générale des bienfaits de l'activité physique sur la santé. Les études ayant rapporté une augmentation de la production de radicaux libres suite à un exercice ne révèlent pas majoritairement de dégâts importants au niveau systémique (Margaritis et coll., 1997). Ces radicaux libres produits par la mitochondrie à l'exercice pourraient ne pas être impliqués dans

l'apparition de pathologies par dégradation cellulaire mais au contraire favoriser des mécanismes d'adaptation bénéfique par signalisation.

Après 40 ans de travaux liant l'activité physique et la mitochondrie, les mécanismes adaptatifs exacts de la chaîne respiratoire mitochondriale à l'exercice restent encore à élucider.

Notre travail a consisté en l'étude, sur modèle animal, des adaptations fonctionnelles de la chaîne respiratoire mitochondriale musculaire et hépatique suite à une activité physique aigue ou chronique. Deux axes de recherche ont donc été menés en parallèle et seront traités dans deux parties distinctes.

La première partie de notre étude a eu pour objectif d'observer les adaptations aiguës de la mitochondrie à la suite d'un exercice unique. L'intérêt majeur de ce premier travail était d'observer si la chaîne respiratoire mitochondriale pouvait jouer un rôle fondamental, via les espèces radicalaires de l'oxygène, dans la signalisation cellulaire à l'origine de la biogenèse mitochondriale induite par l'exercice.

La deuxième partie de notre travail a porté sur l'étude des adaptations liées à l'activité physique chronique. Après avoir montré des variations quantitatives de biogenèse mitochondriale à la suite d'un entraînement en endurance, nos résultats confirment que le fonctionnement mitochondrial, et particulièrement la production de ROS au niveau des complexes I et III, est affecté par l'activité physique répétée. Ceci constitue un argument constitutif dans l'hypothèse d'un rôle bénéfique des ROS induits par l'exercice. En complément de cette deuxième partie nous avons étudié l'impact du coactivateur transcriptionnel PGC-1 α sur la biogenèse mitochondriale en se portant sur les versants quantitatifs et qualitatifs des adaptations qu'il provoque.

Afin de placer les travaux présentés dans ce manuscrit dans un contexte général et scientifique, nous aborderons dans une revue de littérature les connaissances actuelles sur le stress oxydant ; la production mitochondriale de radicaux libres ; le fonctionnement mitochondrial et ses régulations et enfin les influences de l'activité physique sur le stress oxydant.

REVUE DE LITTERATURE

1 Stress oxydant : quand l'oxygène devient toxique !

1.1 Le stress : définition physiologique

D'un point de vue physiologique, un stress est à l'origine d'une perturbation de l'équilibre cellulaire, une perturbation de l'homéostasie, du grec *homoios* (semblable) et *stasis* (position). Au 19^{ème} siècle, le physiologiste français Claude Bernard avançait que «c'est la fixité du milieu intérieur qui est la condition d'une vie libre et indépendante ». Cette remarque marquera le début de nombreux travaux sur la capacité de l'organisme à s'adapter aux variations et agressions environnementales.

Le désordre induit par un stress peut se manifester au niveau de la cellule, d'un tissu, d'un organe, d'un système ou de l'organisme. Lorsque le déséquilibre cellulaire est amorcé, que l'homéostasie est rompue, que la capacité d'adaptation physiologique est dépassée, le stress apparaît. L'ampleur de cette perturbation est dépendante de l'intensité et de la durée du stress. Pour les physiologistes de l'exercice, le terme stress implique des perturbations de l'homéostasie créées par l'activité physique.

1.2 Le stress oxydant : une histoire d'équilibre redox

Le stress oxydant est défini par Halliwell comme l'incapacité pour l'organisme de se défendre contre les agressions des espèces réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) (Halliwell, 1999). Ces espèces dérivées de l'oxygène représentent la classe la plus importante d'espèces radicalaires ou radicaux libres générés par l'organisme en parallèle des espèces nitrées (RNS : Reactive Nitrogen Species) (Miller et coll., 1990).

Lors d'un déséquilibre entre la production des substances prooxydantes (radicaux libres) et la capacité de défense des antioxydants, la balance redox (Figure 1) ou homéostasie redox se voit déséquilibrée en faveur des oxydants. On parle alors de stress oxydant.

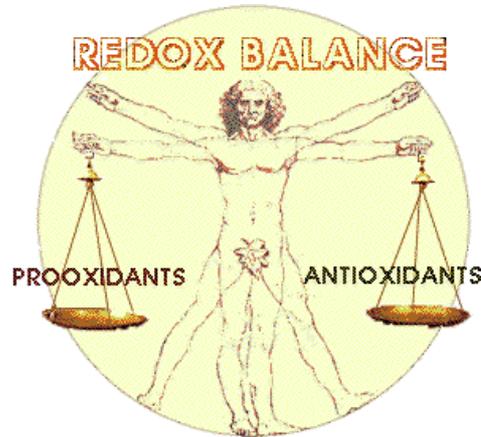


Figure 1 : Illustration de la balance redox entre prooxydants et antioxydants.

Quelles sont ces différentes espèces dérivées de l'oxygène faisant pencher la balance en faveur des prooxydants ? Quelles sont les principales sources de production au niveau cellulaire et les mécanismes majeurs d'élimination ? Comment l'oxygène indispensable aux organismes aérobies, par son utilisation mitochondriale, peut-il devenir source de stress pour l'organisme ?

1.2.1 Historique

Les causes des propriétés délétères de l'oxygène, du grec *oxys* (acide) et *gennan* (engendrer), sont restées obscures jusqu'à la publication de la théorie de Gerschman en 1954. Celui-ci mis en évidence que la toxicité de l'oxygène était due à la réduction partielle de ce dernier (Gerschman et coll., 1954).

L'essor des travaux sur les radicaux libres, à l'origine du stress oxydant dans les systèmes biologiques, n'est venu que dans la fin des années 50. C'est un ingénieur de l'industrie pétrochimique reconverti en biologiste Denham Harman, qui relie le vieillissement à une accumulation de dommages cellulaires (ADN, protéines et lipides) causée par des espèces activées de l'oxygène (Harman, 1956). Les radicaux libres, molécules possédant un électron disponible par réduction de l'oxygène trouvent alors dans leur probable implication dans le vieillissement et les dégénérescences cellulaires leur premier tremplin scientifique et médiatique.

L'oxygène présente donc des propriétés paradoxales qui le rendent indispensable aux organismes aérobies tout en représentant pour eux une menace permanente. La présence de

radicaux libres dans le matériel biologique a trouvé ses fondements scientifiques il y a donc de cela 50 ans (Commoner et coll., 1954). Les premières hypothèses proposaient que les radicaux libres fussent formés comme produits de réactions enzymatiques *in vivo*. Ils étaient considérés comme une véritable « boîte de Pandore », à l'origine de dommages cellulaires, de mutations géniques, du développement de cancers et des processus de dégénérescence liés au vieillissement (Harman, 1956, 2003, 2006).

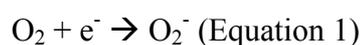
La science des radicaux libres dans les organismes vivants est entrée dans une deuxième ère après la découverte de l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase (SOD) (McCord et Fridovich, 1969). L'identification d'une enzyme dédiée uniquement à protéger l'organisme contre les effets délétères des radicaux libres révéla que ces espèces chimiques pouvaient avoir un rôle important dans le fonctionnement cellulaire. Le véritable départ des recherches sur les radicaux libres fût alors déclenché. De nombreuses recherches portèrent alors sur les dommages oxydants causés par les radicaux libres sur l'ADN, les protéines, les lipides et bien d'autres composants de la cellule.

Une troisième ère a commencé avec la description plus précise des effets biologiques positifs des radicaux libres (Mittal et Murad, 1977). La balance délicate entre leurs effets positifs et délétères apparaît clairement comme un aspect important de la vie. La recherche sur la « régulation redox » prend rapidement de l'ampleur en raison de son impact en physiologie, en biologie cellulaire et en médecine clinique (Beckman et Ames, 1998).

1.2.2 Les différentes espèces radicalaires de l'oxygène

Les radicaux libres (Tableau 1) sont des espèces chimiques, atomes ou molécules qui possèdent un électron célibataire non apparié (Halliwell, 1999). Dans les phénomènes de stress oxydant, les radicaux libres dérivés de l'oxygène ont une propriété caractéristique commune, qui est celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène.

Dans ce cas, le champ magnétique créé par la rotation sur lui-même (ou spin) de l'électron célibataire du radical libre n'est pas compensé par la rotation en sens inverse d'un électron apparié. Cette propriété rend les radicaux libres aptes à réagir avec différentes molécules, notamment lors de réactions en chaîne dont l'exemple le plus connu est la peroxydation des lipides. Une première origine des cascades radicalaires est la formation initiale à partir de l'oxygène moléculaire de l'anion superoxyde (O_2^-), le plus courant des radicaux oxygénés libres :



L' O_2^- est alors dismuté très rapidement de façon spontanée ($10^5 \text{ [mol/L]}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) ou par action de la superoxyde dismutase (SOD) ($10^9 \text{ [mol/L]}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Tarpey et Fridovich, 2001) entraînant la production d' H_2O_2 :



La molécule de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ainsi formée, ayant tous ses électrons appariés, est plus un intermédiaire qu'un radical en tant que tel. Cependant, il a un fort potentiel toxique en présence de cations métalliques, ce qui lui confère une place importante dans les réactions oxydantes. Dans la réaction de Haber-Weiss ou réaction de Fenton, des métaux de transition tel que le Fe^{3+} sont réduits par l' O_2^- en Fe^{2+} . Dès lors, l'ion métallique réduit réagit avec H_2O_2 pour générer de l' OH^- , un radical très réactif :



Le radical OH^- est largement considéré comme le plus impliqué dans les dommages cellulaires au niveau protéique, lipidique ainsi que sur les hydrates de carbone et l'ADN (Leeuwenburgh et Heinecke, 2001).

Symbole	Désignation	Effets	Demi-vie	[<i>in vivo</i>]
O_2	oxygène moléculaire	Bi-radical, stable, faible pouvoir oxydant	-	-
O_2^-	anion superoxyde	Radical peu réactif, mais toxique, oxyde les catécholamines, peut former OH^-	Ne peut être calculé sans connaissance des concentrations locales en SOD ($\sim 10^{-6}$ sec.)	10^{-10} M
1O_2	oxygène singulet	Non radical, très réactif	10^{-6} à 10^{-5} sec.	-
H_2O_2	peroxyde d'hydrogène	Non radical, stable, faiblement toxique, diffusible, antiseptique, peut former OH^-	10^{-3} sec	10^{-7} M
OH^-	radical hydroxyle	Très réactif, peu diffusible, initiateur de la lipoperoxydation. Altère protéines, ADN	10^{-9} sec	10^{-15} M

Tableau 1: Les différentes espèces actives dérivées de l'oxygène moléculaire, leurs caractéristiques, demi-vie et concentrations *in vivo*.

1.2.3 Les systèmes antioxydants

Les molécules contrôlant la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène sont désignées par le terme d'antioxydants et peuvent être défini comme des substances qui sont capables, à concentration faible par rapport à celle du substrat oxydable, de retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. La littérature distingue deux principaux groupes d'antioxydants (Powers et Lennon, 1999).

1.2.3.1 *Systèmes non enzymatiques*

Le premier est constitué par les antioxydants non enzymatiques qui piègent directement les radicaux libres et les désactivent. Ils ont principalement une action anti-lipoperoxydante (vitamines C, E (α -tocophérol), caroténoïdes (β -carotène)). Ils sont localisés dans les membranes cellulaires et la mitochondrie, intégrés dans la bicouche lipidique pour les formes liposolubles (β -carotène et vitamines E) et dans le cytosol intracellulaire ou dans les fluides extracellulaires pour les vitamines hydrosolubles (vitamine C).

1.2.3.2 *Systèmes enzymatiques*

Le deuxième est constitué de systèmes enzymatiques regroupant plusieurs familles d'enzymes antioxydantes. Elles sont associées en partie à des oligo-éléments agissant comme cofacteurs et sont situées à proximité des sites de production de ROS (Halliwell, 1999).

On distingue trois enzymes antioxydantes :

- La catalase (CAT)

Elle assure la réduction du peroxyde d'hydrogène en libérant de l'oxygène. C'est une enzyme majeure de détoxification radicalaire qui est présente majoritairement dans les peroxysomes et dans les mitochondries de cœur (Halliwell, 1999).

- La superoxyde dismutase (SOD)

Elle convertit l'anion superoxyde O_2^- en H_2O_2 :



Plusieurs isoformes de la SOD existent et diffèrent par leur séquence protéique et leurs cofacteurs (Fridovich, 1995). Ainsi, la MnSOD comprend 4 sous-unités contenant chacune un atome de manganèse. Elle est localisée dans la mitochondrie. On distingue également la Cu-ZnSOD sous forme d'un dimère dont chaque unité possède 1 atome de cuivre et 1 atome de zinc. Elle est présente chez la plupart des espèces au niveau du cytoplasme. La formation de la MnSOD est inductible par un stress oxydant, contrairement à celle de la Cu-ZnSOD (Murley et coll., 2001).

- Les glutathions peroxydases (GPX)

Elles se définissent comme des enzymes de structure très proche ayant la propriété de réduire les peroxydes. Il existe une forme de GPX cytosolique, une forme plasmatique, une forme gastro-intestinale ainsi qu'une iso-enzyme réduisant directement les phospholipides oxydés, la HPGPx (hydroperoxyde-glutathion peroxydase) (Ursini et coll., 1999). Les GPX nécessitent un cofacteur : le glutathion sous forme réduite (GSH) comme donneur d'électron :



Actuellement toutes les glutathions peroxydases connues sont des enzymes à sélénium.

1.2.4 Les dommages oxydants

Les radicaux libres peuvent diffuser dans le cytoplasme et à travers les membranes, pour aller altérer des composants cellulaires éloignés de leur site de production ou encore pour atteindre d'autres cellules (Boveris et coll., 1972). De plus, l'attaque des composants organiques des cellules (lipides, protéines ou glucides) engendre la transmission d'une cascade radicalaire, soit à l'intérieur d'une même molécule, soit à l'intérieur d'un même tissu en agissant d'une molécule à une autre. En absence d'équipement antioxydant tissulaire efficace pour stopper cet enchaînement radicalaire, le phénomène de dégradation connaît une progression rapide, qui, après interaction avec les autres systèmes tissulaires, devient très vite exponentielle. Cette transmission extrêmement rapide peut alors conduire au transfert de l'agression radicalaire sur plusieurs centimètres au sein d'un tissu en une fraction de seconde (Neuzil et coll., 1993).

1.2.4.1 Peroxydation lipidique

Lorsque les membranes phospholipidiques des membranes cellulaires et subcellulaires sont attaquées par les radicaux libres, une chaîne de réactions peroxydantes s'installe et perturbe la fluidité membranaire. Les membranes cellulaires doivent comporter une fluidité élevée pour maintenir l'homéostasie et l'activité métabolique de l'organisme. Une chute de la fluidité membranaire est observée dans certaines pathologies métaboliques comme le diabète (Hong et coll., 2004). Les réactions radicalaires provoquent des dépôts de lipides oxydés dans les vaisseaux ou les tissus âgés ou génèrent des dérivés carcinogènes. Les dégradations oxydatives des lipides conduisent à la formation éventuelle d'hydrocarbures exhalés comme le pentane (Dillard et coll., 1978), d'aldéhydes comme le malondialdéhyde ou MDA (Ghosh et coll., 1996). Avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE), ces sous-produits de la peroxydation lipidique sont les marqueurs les plus couramment utilisés dans l'étude des dommages radicalaires induits. La peroxydation lipidique entraîne donc la formation en cascade de nombreux produits qui peuvent à leur tour réagir et dégrader les protéines et l'ADN (Marnett, 1999).

Parallèlement, la peroxydation lipidique pourrait jouer, par une boucle de rétrocontrôle, un rôle dans la régulation de la production de ROS mitochondriale. Celle-ci serait diminuée par l'effet découplant du 4-HNE qui agit directement sur les UCP (Uncoupling Protein ou protéine découplante) (Echtay, 2007). Le découplage entre oxydation et phosphorylation, accélère le flux d'électrons et diminue la probabilité d'association de l'oxygène avec un électron au niveau des sites réduits (développé en partie 2.6).

1.2.4.2 Oxydation des protéines

En plus de la peroxydation lipidique, les ROS sont reconnus pour causer des modifications oxydatives au niveau des acides aminés et des protéines des milieux extra et intracellulaire (Stadtman, 1993). Lors de ces oxydations, il se forme des composés carbonylés qui peuvent être dosés et constituent ainsi un des marqueurs les plus communs des oxydations protéiques. Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} , peuvent être classées en deux catégories : celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique et celles qui induisent des modifications des peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique comme le 4-HNE.

Ces changements sont tels qu'ils conduisent à une modification structurale des protéines dont les conséquences sont majeures (perte de fonction catalytique, augmentation de la sensibilité aux protéases...) (Stadtman et Levine, 2000).

Les protéines oxydées ne sont pas uniquement le résultat parmi d'autres de la présence d'un stress oxydant. Il a été mis en évidence que l'oxydation des fonctions catalytiques et structurales de certaines protéines spécifiques était impliquée dans la régulation de processus métaboliques comme le métabolisme du fer régulé par les protéines IRP (Iron Regulatory Protein), ou la régulation des enzymes de la glycolyse anaérobie induite par HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor) (Levine, 2002).

1.2.4.3 Oxydations de l'ADN

Les réactions d'oxydation de l'ADN sont ubiquitaires dans le monde vivant (Cadet et coll., 1999). Les catégories principales de dommages oxydants de l'ADN sont les modifications des bases puriques (Adénine, Guanine) et pyrimidiques (Cytosine, Thymine, Uracile), les cassures simples et double-brin, et l'oxydation des sites abasiques. Il a été reporté que des adduits (addition d'un produit à la molécule d'ADN) pourraient se former entre les bases aminées de l'ADN et des aldéhydes (MDA ou le 4-HNE) (Marnett, 1999) et favoriser des mutations de l'ADN. L'ADN mitochondrial (ADNmt) présente une susceptibilité au stress oxydant 10 fois supérieur à l'ADN nucléaire. En effet, son génome constitué en structure circulaire spécifique, sans introns, sans histones protectrices et avec des mécanismes de réparations limités le prédispose à l'attaque radicalaire.

Le 8-hydroxy déoxyguanosine (8-OhdG) est utilisé comme marqueur des dommages oxydants causés à l'ADN (Radak et coll., 2002). Les attaques radicalaires sur l'ADN se manifestent principalement par des mutations carcinogènes engendrant la synthèse de séquences protéiques incorrectes et des fonctions cellulaires détériorées (Radak et coll., 2002).

1.2.5 Intérêt physiologique des oxydants

Une production faible ou modérée de radicaux libres est nécessaire pour le bon fonctionnement de l'organisme (Droge, 2002). En effet, il est apparu que les formes oxydantes pouvaient assurer certaines fonctions physiologiques fondamentales comme la

régulation du tonus vasculaire (Burke et Wolin, 1987), le contrôle de la ventilation (Prabhakar et Overholt, 2000), la régulation de la production d'érythropoïétine (Fandrey et coll., 1994), l'adhésion cellulaire (Roy et coll., 1999), la réponse immunitaire (Los et coll., 1995) et la mort cellulaire programmée (apoptose) (Dumont et coll., 1999).

Par l'activation de nombreux facteurs de transcription, les ROS jouent aussi un rôle important dans la signalisation cellulaire (Lander, 1997). Certains des oxydants possèdent en effet toutes les caractéristiques biochimiques du second messenger : formation et dégradation enzymatiques, augmentation transitoire de leur concentration, action spécifique.

De récentes recherches font ressortir avec évidence que les ROS produits par la mitochondrie sont primordiaux pour de nombreux processus cellulaires. De façon illustrative, des souris Cu/Zn SOD^{-/-} sont viables alors que les souris Mn SOD^{-/-} ne le sont pas (Huang et coll., 1997). Le fait que la Cu/Zn SOD ne puisse pas compenser la perte de Mn SOD fait ressortir un mécanisme subtil qui réaffirme le rôle vital de l'H₂O₂ produit par la mitochondrie. Ces enzymes antioxydantes auraient un rôle compartimenté qui n'est pas purement lié à la limitation de dommages et la détoxification des ROS (Brookes et coll., 2004).

1.2.5.1 Mécanismes moléculaires de signalisation radicalaire

Chez les eucaryotes, les radicaux libres auraient un rôle important comme molécule signal dans la régulation d'une grande variété de processus biologiques, tels que le transport du glucose, l'activité ATPase, l'expulsion de calcium ou encore la différenciation typologique musculaire (Ji, 2007, Sakamoto et Goodyear, 2002, Taylor et Starnes, 2003, Veal et coll., 2007).

La réduction partielle de l'oxygène à la suite d'une exposition cellulaire à des agents physiques, chimiques ou biologiques, favorise la formation d'anion superoxyde. Par la suite, la déstructuration catalytique ou spontanée de l'anion superoxyde semble être la source biologique principale de production du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). La grande stabilité de l'H₂O₂ de part sa structure non polaire, comparativement à l'O₂⁻, va lui donner les caractéristiques types d'un second messenger lui permettant d'induire diverses réponses biologiques par diffusion spontanée à travers les membranes (Giorgio et coll., 2007).

Pour que l'H₂O₂ se comporte comme une molécule signal, il doit d'abord échapper à son élimination par les antioxydants, puis influencer l'activité de protéines cibles. De plus, ce ne sont que certaines caractéristiques des protéines qui les rendent sensibles à l'oxydation par l'H₂O₂.

Il est reconnu que l'oxydation par l' H_2O_2 des cystéines (acide-aminé naturel possédant un groupement sulfhydrile ou thiol présent dans la plupart des protéines) est le processus majeur de signal cellulaire (Stadtman, 1993). Les résidus cystéines de nombreuses protéines cytosolique sont protonés du fait d'un pH cytosolique faible. Dans ce cas elles sont incapables de réagir avec l' H_2O_2 . Néanmoins, des groupes thiols déprotonés sont utilisés comme espèces réactives dans le mécanisme catalytique de nombreuses enzymes. Pour que l'exposition aux ROS mène à l'oxydation réversible de groupe thiols de résidus cystéines clefs de certaines protéines comme les régulateurs transcriptionnels, les kinases ou phosphatases, les protéines de structures et les enzymes métaboliques, il est donc nécessaire que l'environnement local des cystéines (pH, proximité d'antioxydant, proximité d'autres protéines sensibles à l' H_2O_2) et la constante de dissociation acide (pKa) soient favorables (Veal et coll., 2007).

Il a été montré que l' H_2O_2 participe au processus de signalisation intracellulaire et intercellulaire. Cependant, une concentration d' H_2O_2 intracellulaire proche de $1\mu\text{M}$ est toxique pour la cellule et ne peut alors être utile pour la signalisation (Giorgio et coll., 2007). La concentration d' H_2O_2 utilisée par la cellule pour les processus de régulation est comprise dans une gamme de 1 à 700nM (Antunes et Cadenas, 2001). Néanmoins, l'interaction de l' H_2O_2 avec sa cible ne doit pas être accompagnée d'un changement important de statut redox cellulaire.

In vitro il est difficile de simuler des processus biologiques induits par l'adjonction d' H_2O_2 . En effet, il existe des variations considérables, selon les cellules, dans la concentration de peroxyde d'hydrogène exogène nécessaire à induire une réponse biologique particulière. De plus, il est apparu que l' H_2O_2 ajouté de façon exogène a moins d'effet signal que la production endogène (Choi et coll., 2005). Cette étude montre que l'ajout d' H_2O_2 exogène induit une sur-oxydation des résidus cystéines qui inhibe l'activité de la peroxydase étudiée. En parallèle un stress induit de façon endogène ne révèle pas cet effet sur l'enzyme. Il est donc primordial que les voies redox régulées par le stress oxydant contiennent des molécules senseurs (thiols déprotonés) et que ces sites soient très sensibles aux faibles concentrations de ROS.

Le peroxyde d'hydrogène, présent *in vivo* à des concentrations avoisinant 10^{-7} M (Giorgio et coll., 2007), va activer des boucles de régulation pour stimuler un certain nombre de processus fondamentaux pour la survie cellulaire, tels que la prolifération cellulaire (10^{-8} M) (Foreman et coll., 2003), la différenciation (Li et coll., 2006), la migration (Ushio-Fukai, 2006) ou l'apoptose lors d'une surproduction menant à des concentrations intracellulaires proche de 10^{-4} M (Cai, 2005).

1.2.5.2 Cibles redox-sensibles dans les cascades de signalisation

- Protéines kinases et Phosphatases

Les cascades de signalisation impliquant les MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) sont modulées par des phosphorylations/déphosphorylations multiples au niveau des résidus sérine et/ou thréonine. Ainsi les kinases, JNK et p38, sont fortement activées par les radicaux libres (Guyton et coll., 1996).

Toutes les tyrosines phosphatases ont en commun une séquence peptidique spécifique contenant un résidu cystéine au niveau du site catalytique. L'inhibition, par voie oxydative, de ce site catalytique peut se faire par deux mécanismes ; une oxydation en pont disulfure S-S, qui inhibe également l'activité catalytique (Barrett et coll., 1999) ou une transformation du groupement -SH de la cystéine en groupement oxydé -SOH (acide sulfénique) (Denu et Tanner, 1998). Un résidu cystéine du site catalytique d'une phosphatase doit être à l'état réduit (Cys-SH) pour permettre la catalyse enzymatique. L'inactivation de l'enzyme peut être obtenue par l'H₂O₂ qui entraîne la formation d'un groupe sulfénique (-Cys-SOH).

Ces réactions initiales de phosphorylations/déphosphorylations vont permettre dans la voie de signalisation de déclencher l'activation des facteurs de transcription (Turpaev, 2002).

- Facteurs de transcription

Les ROS peuvent être des activateurs des voies de signalisation au niveau membranaire et cytosolique (phase d'activation) et des inhibiteurs de la fixation des facteurs de transcription sur leur séquence génomique (phase d'exécution) (Thannickal et Fanburg, 2000). En effet, la fixation des facteurs de transcription au niveau de leur site de liaison sur l'ADN est généralement réprimée par les oxydants. Ces régions contiennent de nombreux résidus cystéines dont l'oxydation va provoquer un changement de conformation du facteur de transcription et un défaut de liaison à l'ADN (Barouki et Morel, 2001). Toutefois, il existe dans la cellule, deux protéines, la thioredoxine et Ref-1 (*Redox factor 1*) qui restaurent, lorsque la présence de ROS n'est pas trop importante, les résidus cystéines dans leur état réduit, permettant ainsi l'activation du facteur de transcription (Barouki et Morel, 2001). De nombreux facteurs de transcription montrent une sensibilité redox. Cependant les mécanismes de régulation restent semblables pour la plupart d'entre eux. Nous développerons plus précisément les mécanismes d'activation de NF- κ B et AP-1 qui sont fortement impliqués dans la régulation des systèmes antioxydants (Zhou et coll., 2001).

- *NF-κB*

Le facteur de transcription NF-κB peut être activé par de très faibles quantités d'oxydants, de l'ordre de la micromole d'H₂O₂ (Schreck et coll., 1991). C'est un facteur ubiquitaire jouant un rôle important lors de la réponse rapide à un stress cellulaire. Il a été récemment l'objet de très nombreuses études. Nous ne résumons ici que l'aspect redox de son activation. La présence d'antioxydants tels que la N-Acétyl-cystéine (NAC), les vitamines C et E inhibe cette activation. Les ROS activeraient des kinases chargées de phosphoryler les facteurs I-κB, entraînant ainsi leur dissociation de NF-κB ce qui lève l'inhibition de ce dernier. Une fois activé, NF-κB migre vers le noyau où il se lie à une séquence κB de l'ADN. Cependant, NF-κB (qui comporte une cystéine dans son domaine de liaison à l'ADN) doit être sous forme réduite pour se lier à l'ADN. In vivo, la réduction de la cystéine critique serait assurée par la thiorédoxine ou Ref-1. Il y a donc deux niveaux apparemment antagonistes de régulation redox de NF-κB : la translocation nucléaire et la liaison à l'ADN. Cette opposition est peut-être une voie de rétrocontrôle de l'activation de NF-κB. La régulation redox de NF-κB ne fait aucun doute mais elle reste complexe, d'autant plus que les résultats obtenus dépendent des lignées cellulaires utilisées.

En 2004, Radak et coll. montrent que l'activité physique tend à diminuer le stress oxydant par une diminution de la production de ROS. Ils montrent que l'augmentation des sites d'accroche à l'ADN de NF-κB liée à l'âge, associée avec une augmentation transcriptionnelle de gènes pro-inflammatoire, se retrouve atténuée par l'activité régulière (Radak et coll., 2004).

- *AP-1*

Le complexe AP-1 (*Activator Protein 1*) est composé d'un dimère Jun-Jun ou Fos-Jun, qui sont elles des protéines exprimées par des gènes dits de « réponses immédiates ». Il réagit rapidement à divers stress et active des gènes précoces (Guyton et coll., 1996). Il est activé in vivo par H₂O₂. Cependant sa liaison à sa séquence-cible d'ADN est accrue in vitro par des agents réducteurs comme la NAC. La cystéine 252 de la protéine Jun située dans le domaine de liaison à l'ADN est critique (Abate et Curran, 1990). Son oxydation empêche cette liaison. In vivo, le facteur Ref-1 assure la réduction de cette cystéine. Il faut signaler que l'activation redox d'AP-1 passe sans doute par des kinases. Les Jun kinases (JNK) sont en effet activées en quelques minutes par l'H₂O₂. À l'instar de NF-κB, activation et liaison à l'ADN sont deux étapes différemment sensibles à l'état redox de la cellule. La production de ROS conduit à

l'activation alors que l'oxydation de la cystéine 252 inhibe la liaison. La mutation de cette cystéine en sérine supprime cette sensibilité à l'oxydation et conduit à l'activation permanente de la liaison à l'ADN (Abate et Curran, 1990).

AP-1 est un facteur de transcription essentiel à la cellule. Sa liaison à sa séquence-cible d'ADN permet en effet, lorsque la cystéine 252 de la protéine Jun est réduite par le facteur Ref-1, la transcription de nombreux gènes stimulant l'expression de la plupart des antioxydants cellulaires (Abate et Curran, 1990). Par exemple, l'activation d'AP-1 par les oxydants favorise la transcription du gène γ -glutamylcystéine synthetase (γ -GCS) activant la production de glutathion réduit (Macnee et Rahman, 1999).

L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de NF- κ B bloque l'expression des transcrits de la GPX et CAT induite par oxydation. Ceci confirme l'hypothèse que les ROS peuvent réguler les niveaux d'ARNm d'enzymes antioxydantes en agissant sur les facteurs de transcription comme NF- κ B ou AP-1 (Zhou et coll., 2001).

1.2.6 Implication des ROS dans les pathologies.

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur-exprimant certains gènes, le stress oxydant est considéré comme la principale cause initiatrice de nombreuses pathologies souvent liées au vieillissement : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire. Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de pathologies plurifactorielles telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardio-vasculaires (pour revue, (Droge, 2002). Enfin dans certaines pathologies, la cause initiale ne fait pas intervenir de processus radicalaire, mais la survenue secondaire de ce stress vient aggraver le processus initial. Un exemple caractéristique de cette situation est le SIDA où le processus initial est l'infection virale, mais où le virus induit un stress oxydant en réprimant le gène de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase facilitant la mort des lymphocytes T par apoptose (Israel et coll., 1992). Tous ces désordres biochimiques impliquent le stress oxydant dans de nombreuses maladies, soit comme un des facteurs déclenchant, soit comme une cause de complications dans leurs évolutions. Cependant, la toxicité des ROS ne résultera que d'un excès de ces radicaux provenant d'un défaut de capacité antioxydante, ou d'une production massive de ROS par un emballement des mécanismes physiologiques (inflammation, activité

physique...) ou une exposition à des sources exogènes liées à l'environnement (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma ou ultra violets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques...).

Des altérations morphologiques de la mitochondrie sont reportées dans de nombreuses pathologies. Ces mitochondries qui sont des structures prédominantes dans la production de ROS, point qui sera développé dans la partie qui suit, pourraient donc être impliquées dans l'apparition de ces pathologies « ROS-dépendantes ».

1.2.7 Les différents sites de production

La formation des ROS est la conséquence inévitable de la consommation d'oxygène et de la production d'énergie par l'organisme. De nombreux composants cellulaires, par réactions enzymatiques ou auto-oxydation, donnent naissance aux ROS et en particulier à l'anion superoxyde au cours de leur métabolisme normal. Ainsi, les principales voies physiologiques de production de ROS sont : la phagocytose ou « flambée respiratoire », les oxydases avec en particulier la xanthine oxydase, les NO synthases, le métabolisme de l'acide arachidonique et enfin la chaîne respiratoire.

La majeure partie de l'oxygène consommé par l'organisme est utilisée dans la mitochondrie, au niveau de la chaîne respiratoire, pour le métabolisme des substrats et la production d'ATP. Il s'agit de l'oxydation phosphorylante mitochondriale. Environ 1 à 3 % de l'oxygène consommé lors de l'oxydation phosphorylante ne sont pas complètement réduits et se voient dirigés vers la production radicalaire (Boveris et Chance, 1973). Ces estimations de la production permanente de ROS sont réalisées *in vitro*, sur mitochondries isolées, en présence d'une pression partielle non physiologique et de concentration saturante de substrats. Il semblerait que la production *in vivo* soit plus précisément de l'ordre de 0,4 à 0,8 %. (Hansford et coll., 1997, St-Pierre et coll., 2002) voir même fixée à une limite haute de production de 0,15% (Brand et coll., 2004).

Les sources d'espèces réactives de l'oxygène, comme l'anion superoxyde, le radical hydroxyle, le peroxyde d'hydrogène et d'autres peuvent être à la fois d'origine exogène et endogène. La production de ROS implique les lysosomes (organites présents dans le cytosol qui ont pour principal fonction la digestion cellulaire et le recyclage de la matière organique intracellulaire), les NADPH oxydases (complexe enzymatique multiprotéique, appartenant

aux phagocytes), la lipoxygénase 5 (enzyme appartenant à la classe des oxydoreductase), la xanthine oxydase (localisée principalement dans le foie, enzyme impliquée dans le métabolisme de l'acide urique), le cytochrome P450 (situé sur la face interne du réticulum endoplasmique lisse ou de la mitochondrie) qui métabolise de nombreux composés endogènes et exogènes. Les effets des métaux lourds, des rayons gamma et UV sont aussi accompagnés par la formation de ROS. Cependant la chaîne respiratoire mitochondriale est considérée aujourd'hui comme la source majeure de production de ROS dans de nombreux organes (Chance et coll., 1979). Cette constatation est acceptée par la majorité de la communauté scientifique (Balaban et coll., 2005) malgré le scepticisme de certains sur les techniques de détermination, faisant de cette source une production artefactuelle (Nohl et coll., 2005).

Sans négliger l'existence des différentes voies de production, nous étudierons principalement dans cette étude la structure énergétique principale de l'organisme : la mitochondrie.

Ce travail a pour but de mieux comprendre les processus de régulation des mécanismes fondamentaux de la production mitochondriale de radicaux libres. Plus qu'une étude quantitative, souvent critiquée, notre travail s'oriente sur l'étude des mécanismes adaptatifs de la chaîne respiratoire mitochondriale en réponse à l'activité physique.

Pour cela, il nous a semblé nécessaire de rappeler dans un premier temps les informations concernant la structure et la fonction de cet organite au cœur de la vie cellulaire.

2 Stress oxydant : quand l'oxydation phosphorylante mitochondriale devient une source radicalaire

2.1 La mitochondrie : généralités

Le mot mitochondrie dérive du grec mitos, « filament », et chondros, « graine » en raison de l'aspect de cet organe au microscope optique et électronique (Figure 2).

Les mitochondries sont des organites polymorphes présents dans le cytoplasme des cellules. Leur nombre et leur taille sont hautement variable et dépendent du type cellulaire observé : on en dénombre par exemple environ un millier dans un hépatocyte normal, avec une taille comprise entre 0,5 et 5 μ m (Delbart, 2001). Les mitochondries ne sont pas des organites statiques : elles se scindent ou, au contraire, fusionnent couramment ce qui explique leur polymorphisme au sein d'une même cellule.

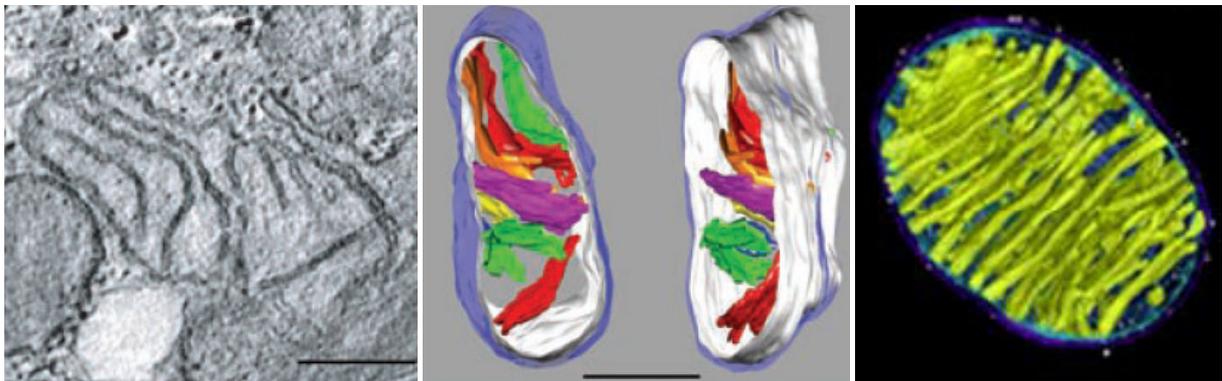


Figure 2: Mitochondries observées par microscopie optique et électronique

(Duchen, 2004, Sun et coll., 2007).

Localisées en divers points de la cellule, généralement à proximité des zones de haute consommation énergétique et au proche voisinage du noyau, les mitochondries apparaissent parfois en couronnes péri-nucléaires. Leur étroite relation les unes avec les autres, mise en avant par les études de fissions et fusions (Chan, 2006) laisse penser à une structure en réticulum ou chondriome. Les mitochondries sont aussi impliquées dans des relations fonctionnelles avec de nombreux autres compartiments ou éléments cellulaires.

Quelque soit le type cellulaire, les mitochondries présentent une ultrastructure commune. Elles sont entourées d'une double membrane délimitant un espace intermembranaire et la matrice mitochondriale (Figure 3) (Palade, 1953).

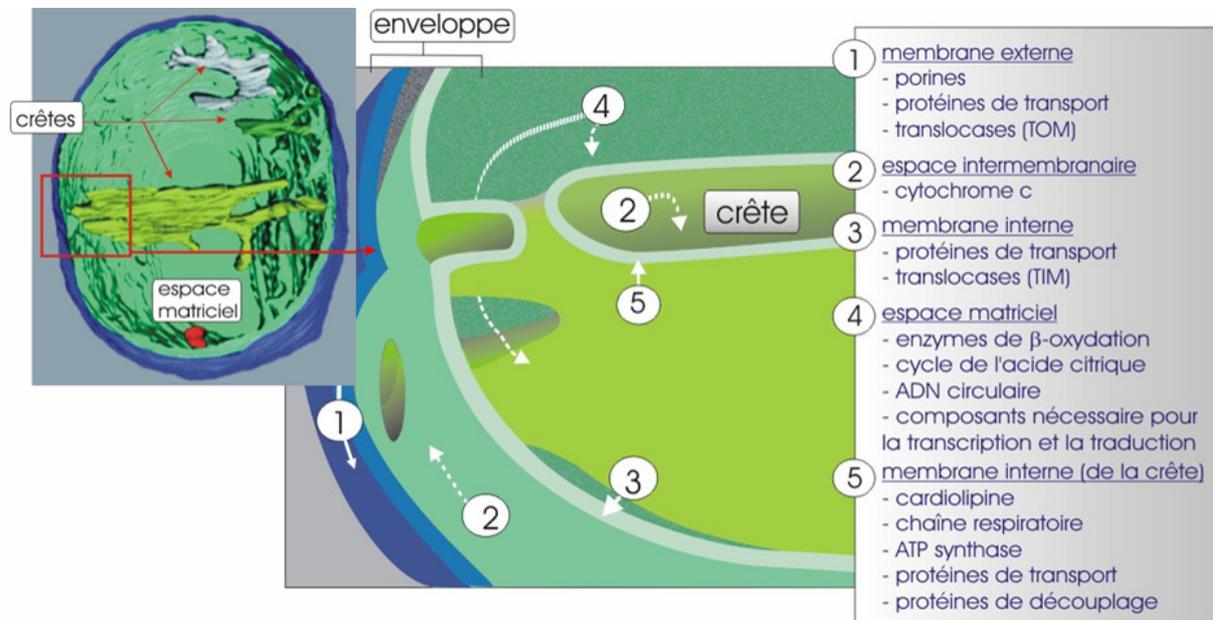


Figure 3: Structure et compartiments mitochondriaux avec leurs principaux constituants

La membrane externe permet l'échange d'un grand nombre de composés avec le compartiment cytosolique. La présence de protéines en quantités abondantes de types porines ou VDAC (Voltage-Dependant Anion Channel) lui confère une perméabilité élevée à diverses molécules. De ce fait, cette membrane est perméable à toutes les molécules d'une taille inférieure à 10 kDa (Ha et coll., 1993). Elle contient aussi des translocases ou transporteurs protéiques, impliqués dans l'import des protéines en provenance du cytosol.

La membrane interne, présente de nombreux replis qui augmentent sa surface : « les crêtes mitochondriales ». Elle délimite un volume central appelé matrice mitochondriale. La composition lipidique de la membrane interne est particulière : elle contient une majorité de phosphatidylcholine et de cardiolipine lui conférant une imperméabilité aux ions. La cardiolipine détermine aussi la structure quaternaire (et donc fonctionnelle) des protéines enzymatiques mitochondriales et assure la bonne orientation et la bonne position (pour faciliter le passage des électrons) des différents composants de la chaîne respiratoire (Schlame et coll., 2000). Dans cette membrane interne on trouve la chaîne de transport d'électrons, l'ATP synthase et de nombreux transporteurs spécifiques qui assurent le passage d'éléments

nécessaires à la production d'ATP. La membrane interne contient elle aussi des translocases impliquées dans l'import des protéines.

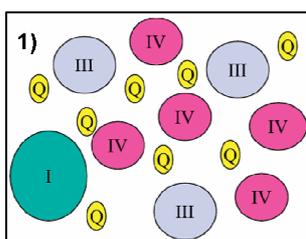
La matrice mitochondriale, délimitée par la membrane interne est le siège des réactions du cycle de Krebs et de la β -oxydation (Kennedy et Lehninger, 1950) et contient le génome mitochondrial. En effet, la mitochondrie contient son propre ADN circulaire. Chez l'homme il est composé de 16 kilobases, codant pour 13 protéines, 22 gènes ARNt et 2 ARNr. L'ADN mitochondrial (ADNmt) ne représente cependant qu'une faible fraction de protéines totales impliquées dans la synthèse ou biogenèse mitochondriale. Le reste des protéines mitochondriales est encodé par le génome nucléaire (Anderson et coll., 1981).

Dans les systèmes eucaryotes, la mitochondrie est le siège de l'oxydation phosphorylante, un processus qui permet la production d'ATP en couplant l'oxydation complète des nutriments à la phosphorylation de l'ADP (Lehninger et Smith, 1949). Cette voie de transduction de l'énergie s'effectue au niveau de la membrane interne mitochondriale où coexistent un système générateur d'énergie potentielle, la chaîne respiratoire, et un système utilisateur, la F_0F_1 -ATP synthase (Mitchell, 1961).

2.2 Organisation de la chaîne respiratoire mitochondriale et de l'ATP synthase.

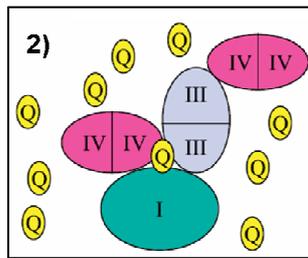
En dépit des connaissances détaillées sur la structure individuelle des complexes de l'oxydation phosphorylante (Green et Tzagoloff, 1966), l'organisation de ces complexes au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale reste largement méconnue et controversée.

Depuis les travaux de Hackenbrock en 1976 et ceux de Hatefi, Y en 1985, deux modèles pour l'organisation de la chaîne respiratoire mitochondriale s'opposent (Hackenbrock et coll., 1976, Hatefi, 1985) :



« *random collision theory* » ou « *fluid-state model* » : dans la membrane, les complexes sont séparés les uns des autres et distribués dans le plan de la membrane. Le transfert d'électrons d'un complexe à un autre passe par la libre diffusion des intermédiaires (coenzyme Q et cytochrome c) d'un complexe à l'autre de façon

linéaire (Hackenbrock et coll., 1986).



« *solid-state model* » ou « *respirasome* » : les complexes sont assemblés en une entité structurale et fonctionnelle. Ceci permettrait d'améliorer le transfert des électrons par canalisation, d'augmenter la stabilité des complexes respiratoires, d'assurer l'ultrastructure de la membrane interne et d'augmenter la capacité d'insertion des protéines dans la membrane mitochondriale interne (Boekema et Braun, 2007, Schagger et Pfeiffer, 2000).

Dans les études sur les adaptations mitochondriales, ces deux théories semblent à ce jour difficilement dissociées et dissociables (Genova et coll., 2005).

2.2.1 La chaîne respiratoire et ses constituants : « fluid-state model »

La chaîne respiratoire est constituée de quatre complexes enzymatiques qui peuvent être tour à tour accepteur ou donneur d'électrons selon leur potentiel redox respectif (Figure 4).

D'un point de vue structural, (Schwerzmann et coll., 1986) ont calculé la présence d'un complexe des oxydations phosphorylantes par 150 nm² de membrane interne dans des mitochondries isolées de foie de rat. Une seule mitochondrie de foie contiendrait environ 10 000 ensembles respiratoires, ce nombre étant supérieur dans le rein et presque deux fois plus important dans le muscle.

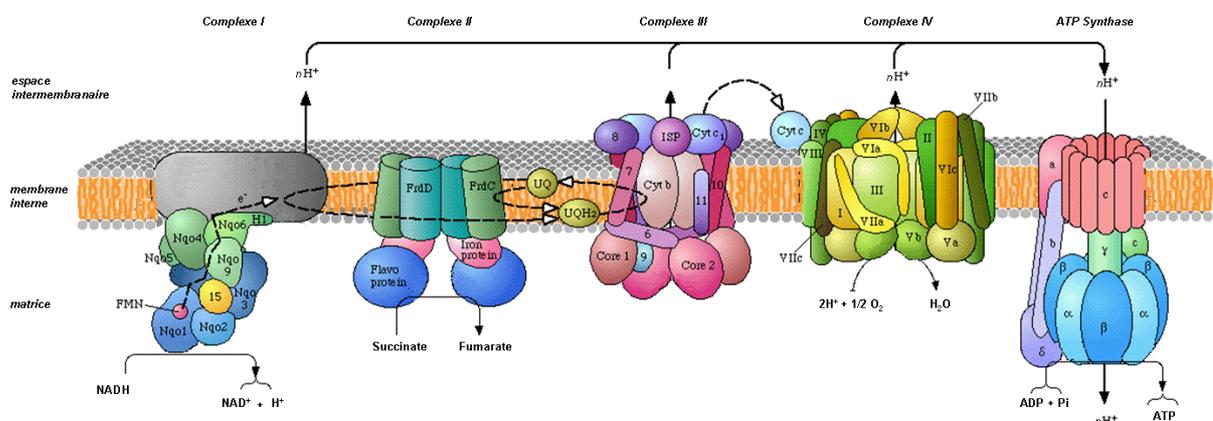


Figure 4: Représentation linéaire de la chaîne respiratoire mitochondriale et de l'ATP synthase

aucun efflux de protons vers l'espace intermembranaire. Le TTFA ou le malonate sont des inhibiteurs spécifiques du complexe II. Le malonate est un petit diacide compétitif vis à vis du succinate. Le TTFA est un chélateur de métaux lourds utilisé pour le dosage de l'Uranium.

2.2.1.3 L'ETF-QO (ou electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase)

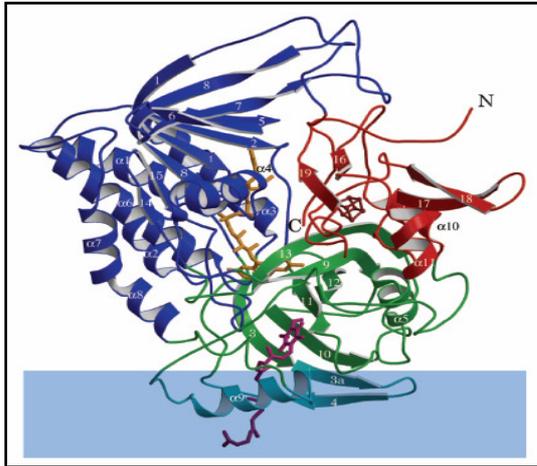


Figure 7 : Structure de l'ETF-QO

C'est une enzyme localisée dans la membrane mitochondriale interne, rarement représentée dans l'organisation de la chaîne respiratoire (Figure 7 - (Zhang et coll., 2006)). Située en aval du complexe I, L'ETF (Electron Transfer Flavoprotein) et l'ETF-QO lient l'oxydation des acides gras à la respiration mitochondriale. Les Acyl-CoA issus de la β -oxydation sont captés par l'Acyl-CoA deshydrogénase qui cède un électron à l'ETF. Ce dernier réduit l'ETF-QO qui transfère ses électrons au pool soluble d'ubiquinone.

2.2.1.4 Le complexe III (ou complexe bc_1 ; ubiquinol-cytochrome c réductase)

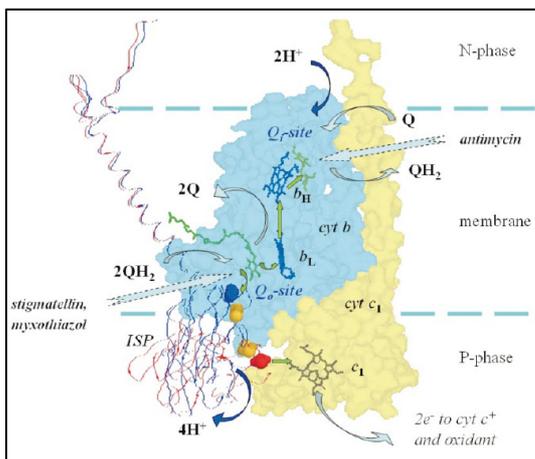


Figure 8 : Structure du complexe III

C'est un dimère d'un poids moléculaire de 300 kDa (Figure 8). Ce complexe respiratoire comprend 10 sous unités codées par l'ADN nucléaire et 1 par l'ADN mt. Il est oxydé par le pool soluble de quinones réduites et constitue donc le carrefour commun à ces navettes intramembranaires provenant des complexes I et II ou d'autres déshydrogénases membranaires (ETF-QO). Le transfert des électrons de l'ubiquinol au cytochrome c s'effectue par l'intermédiaire du cycle Q (quinone) de ce complexe. Il est couplé à une translocation de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. En plus de constituer la deuxième pompe à protons de la chaîne respiratoire, le complexe III est également le deuxième site de production de ROS (Kwong et Sohal, 1998). L'antimycine A et

le myxothiazol inhibent le complexe III à différentes étapes du transfert d'électrons. Ils agissent respectivement aux niveaux du cytochrome *b* et du centre Fer-Soufre (Figure 8).

2.2.1.5 Le complexe IV (ou cytochrome oxydase)

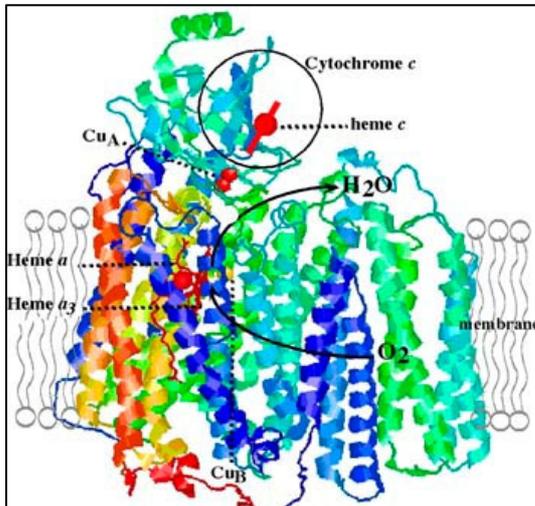


Figure 9 : Structure du complexe IV

Complexe dimérique d'environ 400 kDa, ce dernier polypeptide de la chaîne est composé de 10 sous unités codées par le noyau et 3 par l'ADNmt (Figure 9). Il catalyse la dernière réaction d'oxydo-réduction de la chaîne respiratoire mitochondriale qui permet de coupler le transfert irréversible d'électrons du cytochrome *c* à l'oxygène à un transport vectoriel de protons à travers la membrane interne mitochondriale (Shimokata et coll., 2007). L'oxyde de carbone et les cyanures sont des inhibiteurs des enzymes

ayant l'oxygène pour substrat, comme c'est le cas pour la cytochrome oxydase.

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

2.2.1.6 ATP synthase (Complexe F_0-F_1)

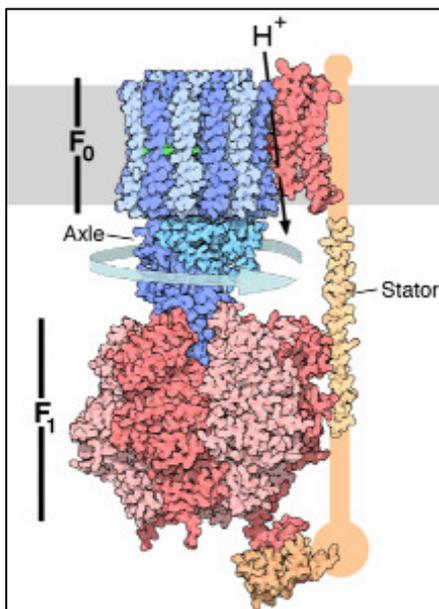


Figure 10 : Structure du complexe F_0-F_1

L'ATP synthase associe la diffusion facilitée des protons à la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de Pi (Phosphate inorganique). Le site catalytique est appelé F_1 et la sous-unité F_0 est constituée d'un canal transmembranaire à protons (Figure 10). Selon la théorie chimio-osmotique de (Mitchell, 1961), l'oxydation des équivalents réduits (NADH et $FADH_2$) au niveau des deux premiers complexes et le transfert subséquent des électrons à travers la chaîne respiratoire sont couplés à un transport vectoriel de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Du fait de la faible conductivité de la membrane interne pour la majorité des substances chargées, celle-ci s'avère très peu perméable

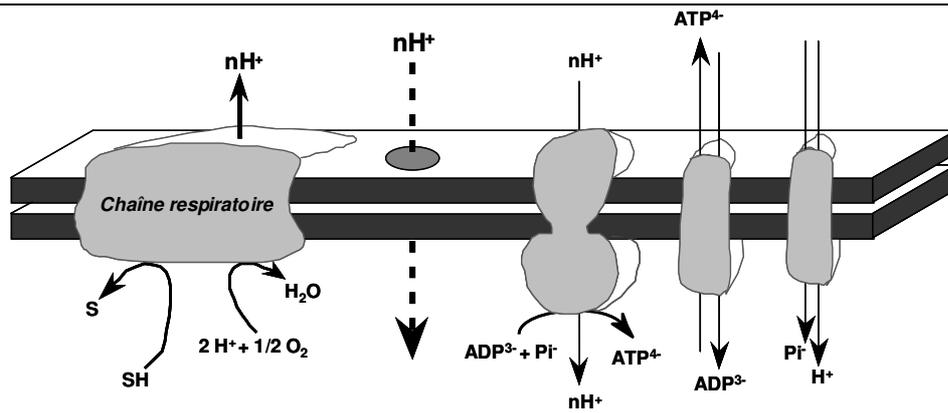
aux protons, permettant la génération d'un gradient électrochimique de part et d'autre de cette membrane. Ce gradient constitue une force électromotrice, nommée force protomotrice (Δp), dont les deux composantes sont la différence de potentiel électrique ($\Delta\Psi$) et le gradient de pH (ΔpH) transmembranaire. Ce complexe enzymatique permet la conversion de la différence de potentiel électrochimique en énergie chimique (ATP) au travers d'un processus réversible.

Le mécanisme de synthèse de l'ATP repose sur une catalyse multisite où l'ADP et le Pi se fixent pour permettre la libération d'ATP. L'oligomycine est un inhibiteur spécifique.

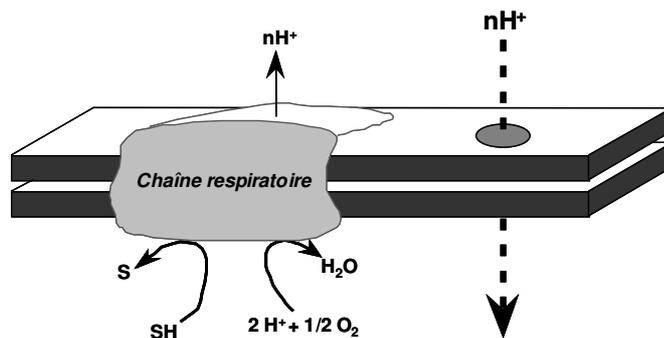
Nous verrons que ce couplage peut être plus ou moins efficace. Selon la disponibilité en ADP, il a été défini des états respiratoires (Figure 11):

- *état respiratoire de repos* (état 4) : en absence de phosphorylation, les oxydations sont limitées par l'accumulation de H^+ dans l'espace intermembranaire. Cet état correspond à la consommation basale d'oxygène. Dans la littérature, cet état est aussi rapporté sous la désignation d'état 2, du fait qu'il précède l'état 3 dans les mesures respiratoires *in vitro*.
- *état respiratoire stimulé* (état 3) : la présence d'ADP active l'ATP synthase qui le phosphoryle en ATP.

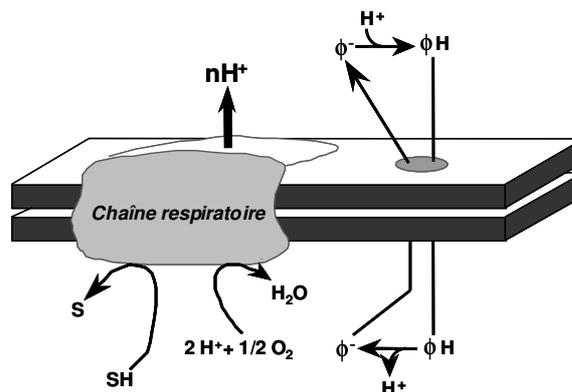
La situation rencontrée au sein d'une cellule est celle d'un état intermédiaire entre les états 2 et 3, plus proche de l'état 2. Dans des conditions physiologiques, il est estimé que les mitochondries de mammifères seraient à 60-70% en état 2 respiratoire et 30-40% en état 3 phosphorylant (Boveris et coll., 1999).



Etat 3 de respiration : En présence d'ADP, les réactions d'oxydation sont couplées à la synthèse d'ATP par la F_0F_1 -ATP synthase (ATPase). L'équilibre entre l'influx et l'efflux de protons *via* la membrane mitochondriale interne contribue au maintien de la force protonmotrice. Cet équilibre est assuré par plusieurs mécanismes : la chaîne respiratoire réalise l'efflux de protons dans l'espace intermembranaire alors que l'influx est dû simultanément à l'ATPase, à certains transporteurs de la membrane mitochondriale interne et au *leak*. Dans les conditions physiologiques, l'ATPase est l'élément contribuant de façon majeure au retour des protons dans la matrice mitochondriale.



Etat 4 de respiration : La vitesse de respiration est contrôlée par la réentrée passive des protons à travers la membrane mitochondriale interne (*leak ohmique*) et par les autres phénomènes dissipateurs d'énergie (*leak non ohmique* et *slipping*).



Etat découplé : Le découplant protonophore permet une diffusion facilitée des protons dans le sens de la dissipation du gradient électrochimique de protons. Dans des conditions où la quantité de découplant ajoutée stimule la vitesse de respiration de façon maximale, le flux n'est plus contrôlé que par le potentiel redox et les propriétés cinétiques de la chaîne respiratoire.

Figure 11: Les différents états de respiration

(Nogueira, 2001)

2.2.2 Les supercomplexes « respirasome »

La répartition moléculaire des complexes de la chaîne respiratoire est le sujet bouillonnant des études récentes sur la structure mitochondriale (Navarro et Boveris, 2007). La détermination classique, spectrophotométrique, des complexes et transporteurs respiratoires de mitochondries isolées (Chance et Williams, 1956) et les déterminations par sonication ou traitements chimiques (Green et Vande Zande, 1982) montrent qu'il y aurait une répartition molaire simple entre les différents complexes. Cependant, les données récentes indiquent que les transporteurs et complexes respiratoires sont arrangés en un « ensemble » comprenant des interactions protéines-protéines nécessaires à un transfert rapide d'électrons par limitation des distances intermoléculaires.

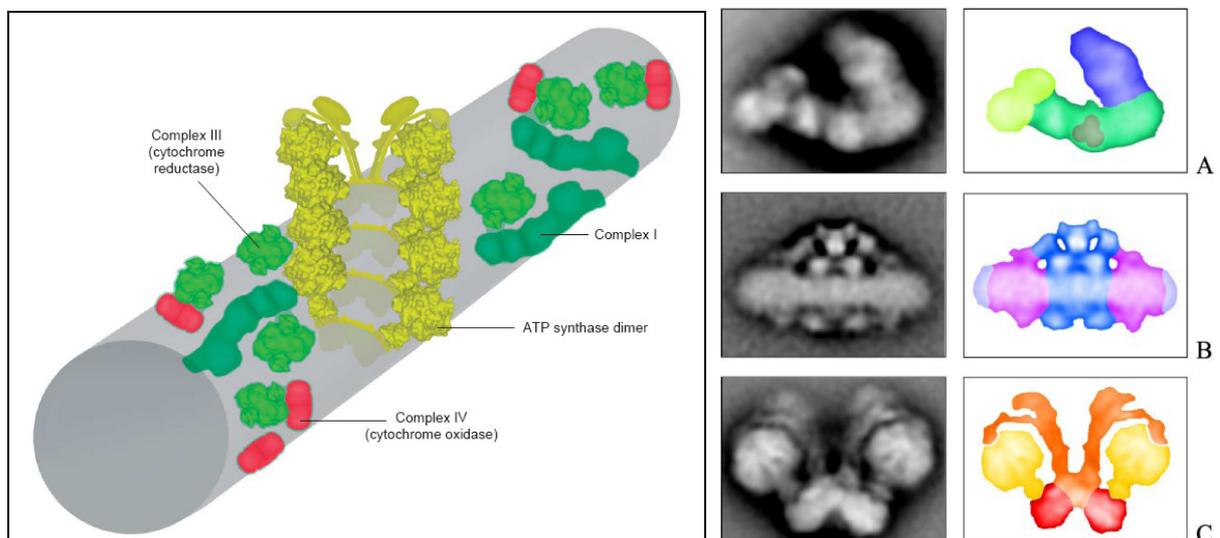


Figure 12 : Schéma illustratif de l'arrangement mitochondrial des supercomplexes.

Les études contemporaines montrent que les complexes I, III et IV des mitochondries de levures, des plantes supérieures et des mammifères interagissent pour former des supercomplexes avec une composition stœchiométrique définie (Figure 12) (Boekema et Braun, 2007, Dudkina et coll., 2006). Le dimère ATP Synthase (Figure 12-jaune) est disposé en rangée de façon hélicoïdale formant un oligomère. Cet oligomère serait à l'origine des courbures membranaires des crêtes mitochondriales [(C) (Boekema et Braun, 2007)]. Les trois complexes majoritaires de la chaîne respiratoire sont arrangés comme des supercomplexes de part et d'autres de la rangée d'ATP synthase. Le complexe III dimérique (vert clair), le complexe I monomérique (vert foncé) et le complexe IV dimérique (rouge) laissent apparaître sur le schéma différentes structures de supercomplexes [(A) $I+III_2$ et (B) $III_2 + IV_2$; (Boekema et Braun, 2007)]. Les interactions exactes entre les complexes III et IV ne sont pas

encore bien décrites et il reste possible qu'un complexe III s'associe avec deux complexes IV monomériques. Des supercomplexes I_1III_2 et $I_1III_2IV_1$ ont été observés dans la mitochondrie de cœur de bœuf (Schafer et coll., 2006).

Il ressort de ces études que le petit complexe II n'a pas d'association structurale avec les autres complexes (III et IV) et a été volontairement omis sur le schéma de gauche (Dudkina et coll., 2006).

2.3 Contrôle de la respiration mitochondriale

Quelque soit l'organisation spatiale des complexes de la chaîne respiratoire, des études fonctionnelles font ressortir des modifications possibles de son activité. La vitesse de respiration dépendrait de l'hydrolyse de l'ATP et donc des concentrations en ADP et P_i , de l'activité du transporteur de nucléotides adényliques et de la fourniture en substrats de la chaîne respiratoire.

2.3.1 Contrôle par l'apport de substrats

Il est largement reconnu qu'une part importante du contrôle de la respiration est exercée au niveau de l'apport en coenzymes réduits à la chaîne respiratoire. Une augmentation de l'apport en substrats potentialise l'oxydation de coenzymes réduits ($NADH$, $FADH_2$) à différents niveaux de la chaîne respiratoire mitochondriale et stimule la respiration sur mitochondries isolées (Leverve et Fontaine, 2001).

Cette augmentation de la capacité de l'oxydation phosphorylante est dépendante du tissu étudié d'une part et de la nature du substrat fournisseur d'équivalents réduits d'autre part (glutamate/malate, succinate, acides gras...) et du potentiel redox ($NADH/NAD^+$) (Brand et Murphy, 1987).

La majorité des expériences portant sur la régulation de l'oxydation phosphorylante dans les mitochondries isolées sont réalisées en présence de concentrations saturantes de substrats. Néanmoins, dans ces conditions, le transport des substrats respiratoires de même que l'activité des déshydrogénases peuvent exercer un contrôle significatif sur le flux respiratoire de mitochondries isolées en agissant sur la fourniture d'équivalents réduits (Groen et coll., 1982, Tager et coll., 1983).

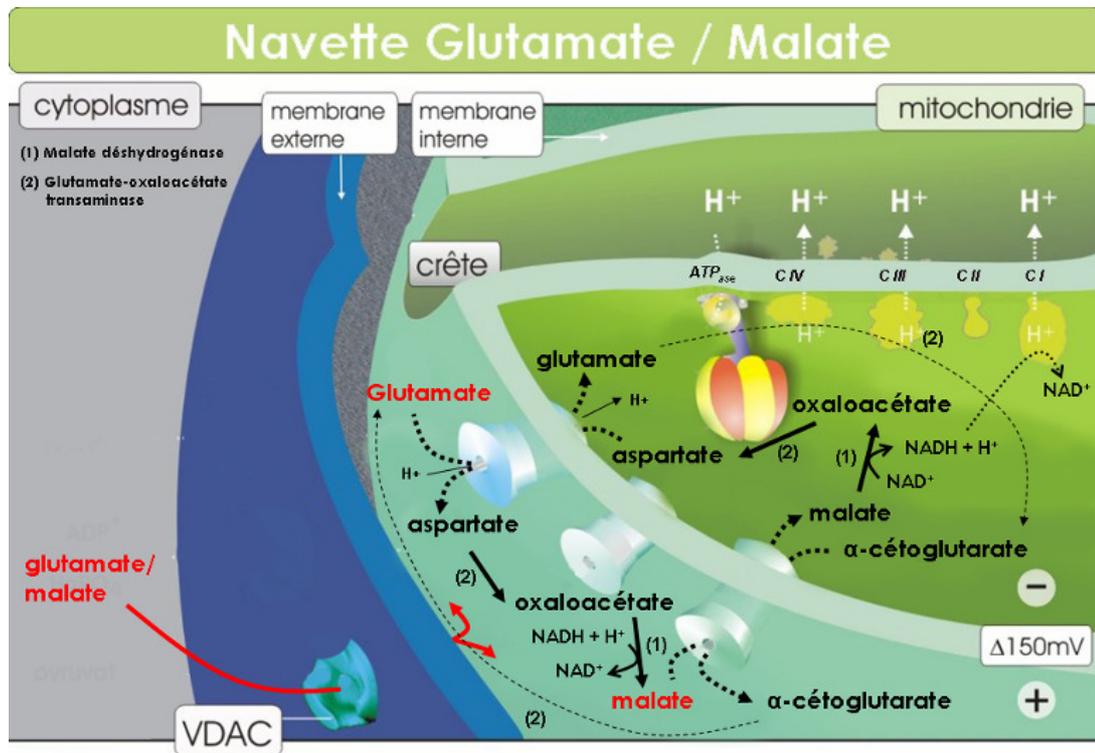
2.3.1.1 *Glutamate / Malate*

Figure 13 : Schéma du transport du glutamate/malate du cytosol à l'espace matriciel.

Lors du fonctionnement de la navette glutamate/malate (Figure 13), les électrons du NADH provenant du cytosol sont transférés sur l'oxaloacétate pour former du malate. Ce dernier, en échange d' α -cétoglutarate entre dans la mitochondrie *via* le transporteur malate/ α -cétoglutarate. Dans la mitochondrie, l'isoforme mitochondriale de la malate déshydrogénase convertit le malate en oxaloacétate en réduisant alors le NAD^+ en NADH. L'oxaloacétate formé au niveau mitochondrial est ensuite transaminé en aspartate par la glutamate-oxaloacétate transaminase, en parallèle de la conversion de glutamate en α -cétoglutarate. L'aspartate quitte la mitochondrie en échange de glutamate cytosolique, qui rentre avec un proton par le transporteur aspartate/glutamate. Pour compléter la navette, l'aspartate est converti en oxaloacétate par la glutamate-oxaloacétate transaminase cytosolique. Cette navette a la particularité d'être réversible, mais comme l'échange entre aspartate et glutamate est électrogénique et s'accompagne du transfert d'un proton, cela favorise l'efflux de l'aspartate et l'entrée de glutamate dans la mitochondrie (LaNoue et Tischler, 1974). L'échange de l'aspartate pour le glutamate semble être l'étape contrôlante de la navette (del Arco et coll., 2002), Le potentiel de membrane joue donc un rôle important dans le transfert des équivalents réduits assuré par cette navette.

2.3.1.2 Succinate

Le succinate peut être converti dans le cytosol par l'isocitrate lyase, enzyme du cycle du glyoxylate, et être transféré vers l'espace matriciel via un transporteur spécifique Sfc1p (succinate-fumarate transporteur) (Palmieri et coll., 1997). Cependant cette enzyme n'existe que chez les plantes, les bactéries et les levures.

Chez les mammifères, le succinate utilisé en substrat exogène principalement dans les études *in vitro* est véhiculé à l'intérieur de la matrice via le transporteur des acides dicarboxyliques (Klingenberg, 1970). Ce transporteur est contrôlé par le phosphate inorganique (Pi). Le Pi qui est fortement impliqué dans la phosphorylation de l'ADP et donc, dans le contrôle de la respiration, a un transport facilité du cytosol vers la matrice qui dépend du malate et du gradient de protons. Le Pi mais donc aussi le malate et le gradient de protons ont donc un rôle important dans le contrôle de l'utilisation du succinate par la mitochondrie.

2.3.1.3 Acides gras

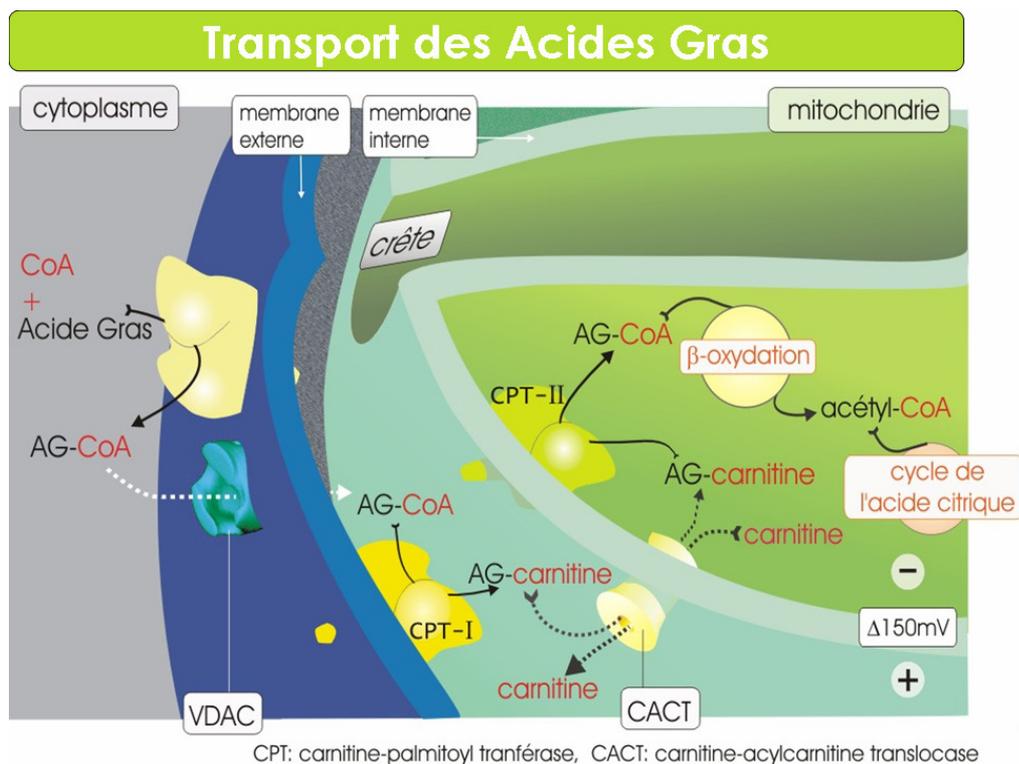


Figure 14 : Schéma du transport des acides gras du cytosol à l'espace matriciel.

Les acides gras (le plus courant étant l'acide palmitique (C16)) traversent la membrane interne de la mitochondrie grâce à une liaison avec la carnitine qui facilite son transport (Palmitoyl-L-carnitine) (Figure 14).

A l'extérieur de la mitochondrie l'acide gras se lie à un coenzyme A (CoA). Il est ensuite rapidement remplacé par un groupe carnitine, formant ainsi un acylcarnitine, dans une réaction catalysée par la carnitine-palmitoyltransférase-I (CPT-I). La carnitine est reconnue par un transporteur situé dans la membrane interne qui échange l'acide gras-carnitine contre une carnitine libre (provenant de l'intérieur). Cet échangeur est appelé carnitine/acylcarnitine translocase (CACT). Dans l'espace matriciel, la carnitine est séparée de l'acide gras par la carnitine palmitoyltransférase-II (CPT-II). L'acide gras se lie alors au CoA, formant un palmitoyl-CoA, disponible pour subir la β -oxydation dans l'espace matriciel

La CPT1, responsable du transfert des dérivés CoA vers la matrice mitochondriale, joue un rôle majeur dans le contrôle du flux à travers la β -oxydation. De nombreux effecteurs de cette voie métabolique agissent par le contrôle de son activité. La concentration en malonyl-coA, en inhibant de façon allostérique son activité, est un régulateur clé de l'activité de la CPT1 (pour revue (McGarry et Foster, 1980)). L'étape catalysée par la CPT1 est souvent considérée comme « l'étape limitante » de la β -oxydation. En effet, l'analyse du contrôle métabolique montre que le coefficient de contrôle de cette enzyme est très élevé (Krauss et coll., 1996, New et coll., 1999). En revanche les deux enzymes en aval de CPT1 : la carnitine-acyl-carnitine translocase et la CPT2 ont une activité importante mais ne jouent pas un rôle contrôlant dans l'oxydation des acides gras.

2.3.2 Contrôle par l'utilisation d'inhibiteurs

Les inhibiteurs de la chaîne respiratoire sont des éléments chimiques qui par leur liaison avec l'enzyme ralentissent la vitesse de réaction enzymatique du complexe cible. Leur action de poison très spécifique a permis d'élucider de nombreux mécanismes du fonctionnement de la chaîne respiratoire *in vitro*.

2.3.2.1 Complexe I : Roténone, Barbituriques, Meperidine

La roténone membre de la famille des roténoïdes, composés cytotoxiques naturels extraits de plantes tropicales, est largement utilisée comme insecticide dans l'agriculture et le jardinage.

Elle a pour effet d'inhiber la NADH-coenzyme Q oxydoréductase en agissant entre le groupement Fe-S du complexe I et le pool soluble des quinones (Lummen, 1998). Elle ralentit

de ce fait l'utilisation par ce complexe du NADH, donneur d'hydrogène, et du coenzyme Q, receveur d'hydrogène. Le ralentissement de la réduction du coenzyme Q prive le complexe III de son coenzyme donneur d'hydrogène, ce qui entraîne une inhibition de la réduction du cytochrome c ferrique en cytochrome c ferreux. Le manque de cytochrome c réduit prive alors la cytochrome oxydase de son coenzyme donneur d'électrons, et par suite cette enzyme utilisera moins d'oxygène, d'où le ralentissement de la respiration. Les réactions d'oxydation au niveau des complexes I, III et IV étant perturbées, le transfert de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire est ralenti. En conséquence, le complexe F₀-F₁ qui trouve l'énergie de son activité dans ce gradient de protons transmembranaire, ne peut plus effectuer la phosphorylation de l'ADP en ATP.

2.3.2.2 *Complexe II : Malonate, Thénoyltrifluoroacétone (TTFA)*

Le Malonate ou le TTFA agissent sur la chaîne respiratoire mitochondriale par l'inhibition de la Succinate déshydrogénase. D'une structure chimique proche du succinate, le malonate se fixe sur le complexe II et empêche sa déshydrogénation (Kim, 2002). De ce fait, il ralentit l'utilisation par ce complexe du Succinate, donneur d'hydrogène, et du coenzyme Q, receveur d'hydrogène. Les hydrogènes apportés par le complexe I seront alors les seuls à parvenir au complexe III. Le manque de cytochrome c réduit provoque alors un ralentissement de la respiration qui favorise une baisse de la phosphorylation de l'ADP en ATP.

2.3.2.3 *Complexe III : Antimycine A, Myxothiazol, Dimercaprol*

L'Antimycine A est un produit antibiotique qui a pour principal effet d'inhiber la coenzyme Q-cytochrome c oxidoréductase ou complexe III au niveau de son centre Q_i (« in »), ubiquinone orientée vers la matrice. L'Antimycine A ralentit l'utilisation par ce complexe de l'ubiquinol (QH₂), donneur d'hydrogène, et du cytochrome c ferrique, receveur d'électrons. Le ralentissement de la réoxydation du coenzyme Q prive les complexes I et II de leur coenzyme accepteur d'hydrogène, ce qui entraîne une inhibition de l'activité de ces deux enzymes et par suite, de l'utilisation du NADH et du succinate. En présence de cet inhibiteur, la cytochrome oxydase est privée de cytochrome c réduit et utilise alors moins d'oxygène. La chaîne respiratoire expulse alors moins de protons, le potentiel s'effondre et entraîne une baisse de la phosphorylation de l'ADP en ATP.

2.3.2.4 *Complexe IV : Cyanure, Oxyde de carbone*

L'ion cyanure est le plus puissant des poisons de la chaîne respiratoire. L'inhibition de la cytochrome oxydase ou complexe IV arrête l'utilisation par ce complexe de l'oxygène, accepteur d'hydrogène, et du cytochrome c, donneur d'électrons. Le ralentissement de la réoxydation du cytochrome c prive le complexe III de son coenzyme accepteur d'électrons ce qui va entraîner une inhibition de l'activité de cette enzyme et par suite, de l'utilisation du coenzyme QH₂. Le manque de coenzyme Q oxydé va priver les complexes I et II de leur coenzyme receveur d'hydrogène, et par suite ces enzymes utiliseront moins de NADH et de succinate. La synthèse de l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate est alors inhibée.

2.3.2.5 *Complexe F₀-F₁ : Oligomycine, Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD)*

L'inhibition de l'ATPase ou complexe F₀-F₁ par l'oligomycine arrête la phosphorylation de l'ADP par ce complexe, grâce à l'énergie fournie par le gradient de protons transmembranaire. L'accumulation des protons dans l'espace intermembranaire va empêcher les complexes I, III et IV de continuer à pomper des protons de la matrice vers cet espace. Les réactions d'oxydations seront donc également inhibées. Le ralentissement de l'oxydation du cytochrome c réduit par la cytochrome oxydase entraînera un ralentissement de l'utilisation de l'oxygène, accepteur d'hydrogène et donc un ralentissement de la respiration. Le ralentissement de l'oxydation du coenzyme QH₂ par le complexe III privera les complexes I et II de leur coenzyme accepteur d'hydrogène ce qui va entraîner une inhibition de l'activité de ces enzymes, et par suite ces enzymes utiliseront moins de NADH et de succinate.

En somme, l'inhibition d'un seul des cinq complexes par un de ces composés entraîne l'inhibition de toute la chaîne respiratoire mitochondriale. C'est pourquoi on groupe tous ces corps sous le nom générique d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale (Raisonnier, 2004).

2.4 Modifications du rendement de l'oxydation phosphorylante

L'oxydation phosphorylante mitochondriale joue un rôle clef dans l'homéostasie énergétique cellulaire car elle assure en permanence la coordination entre la production d'ATP grâce au catabolisme des nutriments et les besoins en ATP. Le rendement de l'oxydation phosphorylante peut être mesuré par le rapport entre les flux d'ATP et d'oxygène (J_{ATP}/J_O). Ce rapport, appelé aussi P/O, varie selon les substrats entre 1.5 et 2.5. Ce rendement est variable et il est reconnu pour être affecté par trois mécanismes différents : une modification de la perméabilité membranaire aux protons (*leak*), une altération du couplage entre le flux d'électrons et l'extrusion des protons par les pompes membranaires (*redox slipping*) ou entre le flux de protons et la phosphorylation de l'ADP au niveau de la l'ATPase (*proton slipping*) et enfin la provenance et la nature des équivalents réduits.

Les phénomènes de *leak* et *slipping* s'opposent au postulat de l'imperméabilité totale de la membrane interne aux protons. Ceci va à l'encontre de l'existence d'une stoechiométrie fixe de couplage entre le transfert d'électrons et le transport vectoriel de protons par les pompes membranaires, ou entre le flux de protons à travers l'ATP synthase et la synthèse d'ATP.

Parallèlement aux concepts classiques de modification du rendement de l'oxydation phosphorylante, nous verrons que le stress oxydant peut lui aussi favoriser une diminution de ce dernier.

2.4.1 Perméabilité membranaire aux protons : Leak

Un des mécanismes affectant le rendement de l'oxydation phosphorylante passe donc par un retour passif des protons (ou fuites), lié à une modification de la conductance membranaire pour ces derniers (*leak*) (Figure 15) (Brand, 1990).

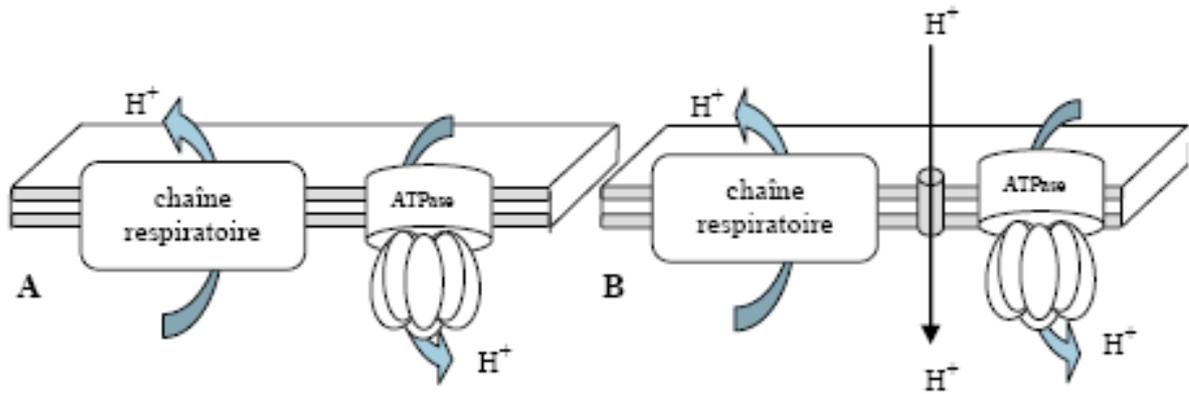


Figure 15 : Phénomène de proton leak

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

2.4.2 Patinage des pompes à protons : Slipping

Le deuxième mécanisme pouvant affecter le rendement de l'oxydation phosphorylante consiste en une perte d'efficacité des pompes à protons se traduisant principalement par un phénomène de patinage de celles-ci, nommé « *slipping* ». Lorsque la pompe est parfaitement couplée, le rapport entre le flux d'électrons à travers elle et le flux de protons expulsé est constant. Par contre, lorsqu'un patinage des pompes se produit, l'efflux de protons devient moindre pour un même flux d'électrons (Figure 16) (Fontaine et coll., 1997, Pietrobon et coll., 1983).

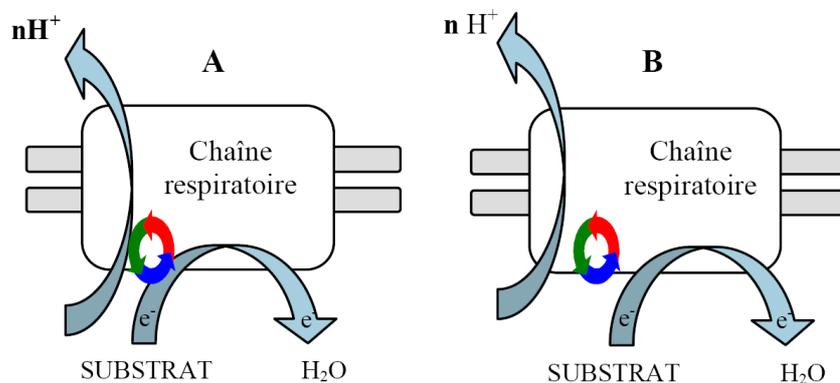


Figure 16 : Phénomène de redox slipping.

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

Le même type de mécanisme peut également se dérouler au niveau du couplage entre le flux de protons à travers l'ATP synthase et la phosphorylation de l'ADP en ATP (Figure 17).

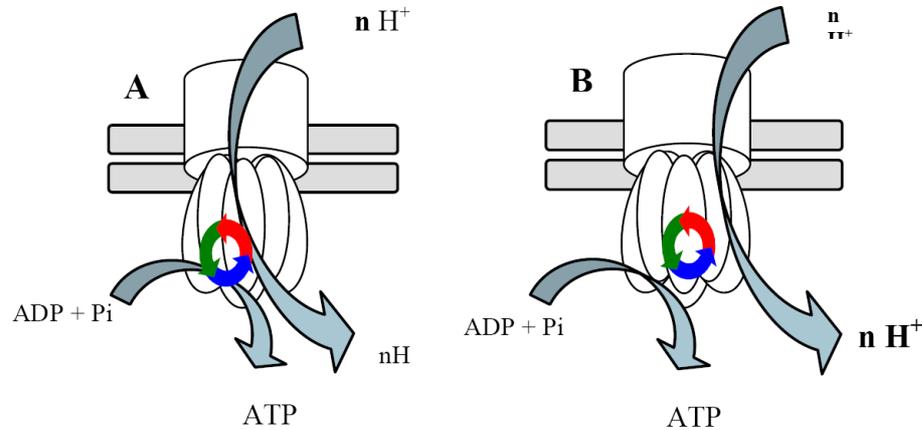


Figure 17 : Phénomène de proton slipping.

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

La variation du couplage entre oxydation et phosphorylation permettrait une adaptation rapide de l'organisme à des stress environnementaux tels qu'entre autres le besoin de production de chaleur ou la réponse à une augmentation de la demande énergétique (Nogueira et coll., 2001).

2.4.3 Nature des équivalents réduits

Le découplage partiel des réactions d'oxydation et de phosphorylation pourrait permettre à la cellule d'adapter son rendement en fonction de ses besoins énergétiques. Cette adaptation passerait notamment par la modulation des substrats respiratoires utilisés, ou plus exactement le nombre de sites de couplage mis en jeu au niveau de la chaîne respiratoire (Nogueira, 2001).

Les substrats dont le métabolisme génère des équivalents réduits NADH, utilisés au niveau du complexe I, stimulent alors trois sites de couplage. Cela induit un rendement supérieur aux substrats générant du FADH₂, oxydé au niveau du complexe II, court-circuitant ainsi le complexe I et ne stimulant que deux sites de couplage.

De ce fait, la différence expliquant la baisse de rendement de l'oxydation phosphorylante lors de l'utilisation des acides gras comme substrat respiratoire comparativement à l'utilisation des hydrates de carbones s'explique par la fourniture à la

chaîne respiratoire d'un rapport d'équivalents réduits NADH/FADH₂ respectivement égal à 2 pour les acides gras et à 4 pour les hydrates de carbone.

2.4.4 Stress oxydant

Si la mitochondrie est largement considérée comme l'une des principales sources de ROS intracellulaires, elle en demeure pas moins la principale cible. Ainsi, l'anion superoxyde produit par la chaîne respiratoire peut réagir avec le monoxyde d'azote (NO) et produire un composé très agressif, le peroxynitrite. Ce dernier a été reporté pour inhiber l'activité des complexes I et II de la chaîne d'oxydation (Shiva et coll., 2004).

Une diminution de la phosphorylation oxydative, peut potentiellement être causée par une altération par le stress oxydant d'une de ses différentes étapes. Ceci peut passer par une limitation de l'apport des métabolites délivrant le flux d'électrons (NADH, FADH₂) aux complexes I et II, la dysfonction du transport des électrons au sein de la chaîne respiratoire, la diminution de la disponibilité en oxygène et le découplage entre potentiel membranaire et gradient protonique altérant la synthèse d'ATP au niveau du complexe F₀F₁-ATPase. Or, différentes études montrent qu'en condition de stress oxydant, la plupart de ces mécanismes sont altérés (Echtay et coll., 2003, Reid, 2000).

En effet, le stress oxydant provoque une diminution significative, voire une inhibition de l'activité des différentes enzymes impliquées dans le cycle de Krebs (Tretter et Adam-Vizi, 2000).

Cette diminution de l'activité des enzymes du cycle de Krebs limite considérablement la disponibilité du NADH pour la chaîne respiratoire, contribuant à l'altération de la phosphorylation oxydative (Humphries et coll., 1998, Tretter et Adam-Vizi, 2000). Les ROS peuvent également altérer les enzymes et complexes mitochondriaux de la chaîne respiratoire : coenzyme Q10 (ubiquinone), complexe III, cytochrome c, complexe IV (Kang et Hamasaki, 2003, Murray et coll., 2003) soit directement par oxydation protéique, soit indirectement par oxydation de l'ADN mitochondrial, qui après mutation, entraîne une altération de la synthèse de ces protéines indispensables au transport des électrons. Comme une partie des sous unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale est codée par l'ADNmt, une altération de ce dernier pourrait effectivement perturber le fonctionnement de la chaîne et déclencher un cercle vicieux augmentant la production de ROS et les dégâts oxydants mitochondriaux.

2.5 Sites de production de ROS de la chaîne respiratoire mitochondriale

De nombreux auteurs s'entendent pour dire que les principales sources de production de ROS mitochondriales sont liées à la réduction importante des complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire (Chen et coll., 2003, Muller et coll., 2004, Turrens, 2003).

Le taux de formation d' O_2^- par la chaîne respiratoire mitochondriale serait contrôlé par une loi d'action de masse :

$$\frac{d[O_2]}{dt} = k \cdot [O_2] \cdot [R^\circ]$$

avec $d[O_2]$: Variation de la concentration en oxygène, dt : variation du temps, k : constante, $[R^\circ]$: Concentration en donneurs d'électrons (sites réduits).

L'augmentation de la concentration en oxygène et la diminution conjointe du flux d'électrons augmentent alors la probabilité de rencontre d'un électron célibataire avec l'oxygène au niveau des sites de production (Turrens et coll., 1982). Pour exemple, lors de l'apparition de la fatigue, ou lors d'une diminution du contenu en ADP, les mouvements de protons à travers l'ATP synthase diminuent, le gradient de protons augmente du fait d'un flux d'électrons qui diminue doucement et la chaîne respiratoire devient alors plus réduite (état 2 de respiration). En résultante, la concentration physiologique d' O_2^- est augmentée (Boveris et coll., 1972).

Les mécanismes précis ainsi que l'identité des composants moléculaires de ces sites de production permettant le passage d'un électron à la molécule d' O_2 pour générer l' O_2^- sont complexes, pas encore bien définis et surtout très controversés (Gonzalez et coll., 2007).

2.5.1 Le complexe I

Pour le complexe I, il est proposé que les flavines mononucléotides [FMN] (Kussmaul et Hirst, 2006) les groupements fer/soufre [Fe/S] (Barja, 1999, Genova et coll., 2001) et les ubisemiquinones (UQH') associées au complexe protéique (Ohnishi et coll., 2005) sont les emplacements hypothétiques du transfert d'électrons vers l' O_2 moléculaire (Figure 18).

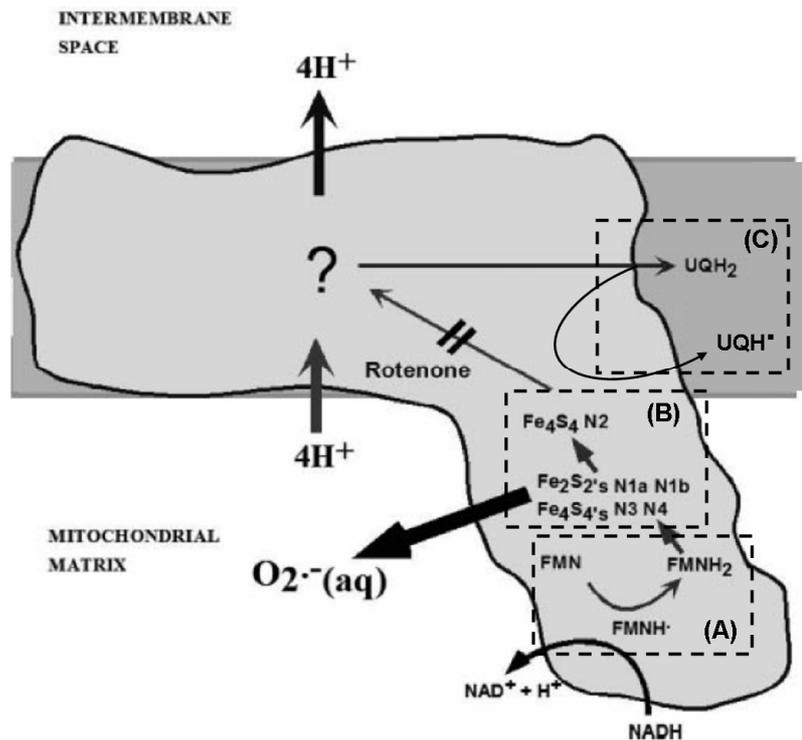


Figure 18 : Sites hypothétiques de production d'O₂⁻ par le complexe I.

(A) Flavines mononucléotides, (B) groupements Fer-Soufre [Fe/S], (C) Ubisemiquinones (Muller et coll., 2004).

Ces trois différentes hypothèses se basent sur le postulat que les sites de production se situent forcément en amont du site de fixation de la roténone (Genova et coll., 2001). Ceci a pu être mis en évidence par des expériences réalisées en présence de succinate, induisant un flux inverse d'électrons du complexe II vers le complexe I. Dans ces conditions, la production d'O₂⁻ est totalement inhibée par la roténone.

Quelque soit le donneur d'électrons parmi ces trois sources potentielles, il apparaît que l'O₂⁻ est produit uniquement vers l'espace matriciel (Muller et coll., 2004).

Avec des substrats fournissant du NADH à partir du cycle de Krebs (ex : Pyruvate) alimentant ainsi le complexe I de la chaîne respiratoire, la roténone augmente la production d'H₂O₂. Quand les mitochondries sont incubées avec du succinate alimentant alors le complexe II de la chaîne respiratoire, la roténone inhibe la production importante de ROS. Ceci montre que la production de ROS à partir d'équivalents réduits FADH₂ issus de la succinate déshydrogénase est en grande partie due au flux inverse d'électrons du complexe II vers le complexe I (Barja, 1999).

2.5.2 Le complexe III

Au niveau du complexe III (Figure 19), l'Ubiquinone (UQ) reçoit 2 électrons du complexe I ou du complexe II et devient complètement réduite en ubiquinol (QH₂). Ce dernier transfère alors un électron au complexe Fer/soufre (Fe/S) de la cytochrome réductase se transformant alors en radical ubisemiquinone (UQH[•]). L'ubisemiquinone peut générer alors l'anion superoxyde en transférant son électron à l'oxygène moléculaire soit vers l'espace intermembranaire soit vers la matrice (Muller et coll., 2004). Dans les conditions normales, 2 molécules d'ubisemiquinone sont recyclées en une molécule d'ubiquinone et une d'ubiquinol avec le concours de 2 cytochromes b. L'antimycine A inhibiteur du complexe III force l'accumulation d'UQH[•] et ainsi la production d'O₂^{-•}.

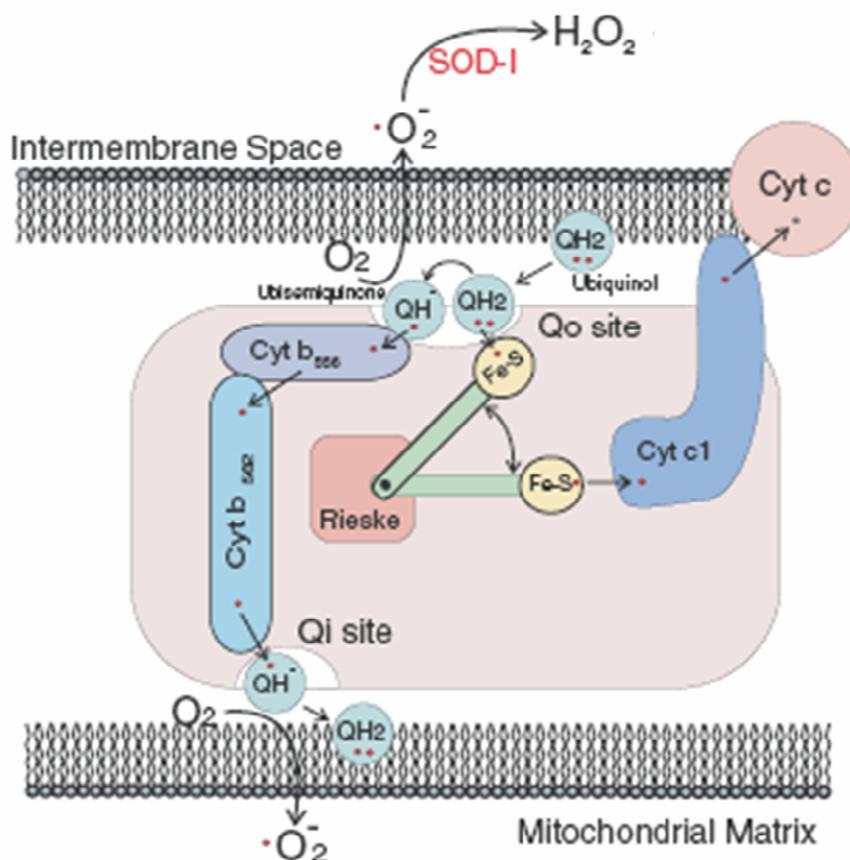


Figure 19 : Sites de production d'O₂^{-•} par le complexe III.

Cyt c : cytochrome c ; Cyt b : cytochrome b ; QH₂ : ubiquinol ; QH[•] : ubisemiquinone ; Rieske : Protéine Fer – Soufre (Guzy et coll., 2005).

2.6 Contrôle de la production mitochondriale de ROS

2.6.1 Contrôle par l'apport de substrats

La production de radicaux libres par la mitochondrie est intimement liée à la fonction primaire de cet organite qui est le métabolisme oxydatif en vue de la synthèse d'ATP. Ce processus implique l'oxydation de métabolites dans le cycle de Krebs formant des équivalents réduits NADH et FADH₂. Dans les études sur mitochondries isolées, pour lesquelles les enzymes glycolytiques sont absentes, les substrats utilisés fournissent soit principalement du NADH (glutamate et malate) soit du FADH₂ (succinate). Lors des mesures en conditions basales (état 2), la consommation d'oxygène est associée à un potentiel de membrane élevé et de ce fait à un état plus réduit des transporteurs d'électrons, la production de ROS dans ces conditions est la plus importante. En condition d'oxydation phosphorylante (état 3), la présence d'ADP stimule la respiration, augmente l'oxydation des transporteurs d'électrons et diminue alors le flux d'électrons s'échappant de la chaîne respiratoire (Boveris et coll., 1972).

Avec le succinate comme substrat, la majorité des électrons descendent vers les complexes III et IV générant cependant un potentiel de membrane suffisant pour conduire une partie du flux d'électrons vers le complexe I : processus énergétique appelé « flux inverse d'électrons » (Chance et Hollunger, 1961). La majorité des ROS produits à partir du succinate est largement due à ce flux inverse d'électrons (Korshunov et coll., 1997, Lambert et Brand, 2004) et cette production est nettement supérieure à celle obtenue en présence de substrats fournisseurs de NADH. Toutefois, ce flux inverse est mis en avant dans des études utilisant des concentrations non physiologiques de substrats. Lors de l'utilisation de concentrations plus faibles, les mitochondries ne produisent pas les quantités de ROS généralement observées (Hansford et coll., 1997, St-Pierre et coll., 2002).

In vivo, le flux inverse est prévenu par le flux descendant d'électrons provenant de l'oxydation du NADH, excepté dans des conditions pathologiques épuisant le NADH. Cette situation peut être observée par exemple chez le sujet diabétique (Turrens, 2003).

Les mitochondries alimentées avec des substrats du complexe I ont une production d'H₂O₂ très faible mais celle-ci devient très intense et roténone sensible lorsqu'on alimente la chaîne au niveau du complexe II avec du succinate. Ainsi il ressort que dans les situations de production forcée de Succinyl-CoA comme c'est le cas dans les situations de manque de substrats glucidiques (ex : diabète et jeûne) et d'oxydation forcée d'acides aminés branchés, la production de ROS par la mitochondrie est exagérée (Gonzalez et coll., 2007).

2.6.2 Contrôle par l'utilisation d'inhibiteurs

Dans la majorité des études, la production de ROS au niveau des complexe I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale est révélée par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces deux complexes que sont la roténone pour le complexe I et l'Antimycine A pour le complexe III (Pour revue (Turrens, 1997).

Les taux de production d' H_2O_2 les plus importants sont observés quand les composants de la chaîne respiratoire mitochondriale sont hautement réduits (état 2). Ainsi, les inhibiteurs respiratoires qui bloquent le flux électronique à travers la mitochondrie et produisent une réduction totale des composants respiratoires situés entre l'entrée des substrats et le site de fixation de l'inhibiteur favorisent une augmentation de la production d' H_2O_2 entre ces deux points. Ainsi la succession d'utilisation de la roténone, inhibiteur du complexe I et de l'Antimycine A, inhibiteur du complexe III permet en présence de différents substrats respiratoires d'isoler fonctionnellement les différents sites de production d' H_2O_2 .

Pour mieux comprendre l'influence de l'activité physique sur les caractéristiques des deux principaux sites de production d' H_2O_2 , la roténone et l'Antimycine A sont ajoutés de façon séquentielle en présence de substrats fournisseurs de NADH pour le complexe I ou de $FADH_2$ pour le complexe II. En présence de substrats fournisseurs de $FADH_2$, la roténone prévient le flux inverse d'électrons vers le site de la NADH déshydrogénase, alors que l'ajout d'Antimycine A bloque le flux d'électrons entre le cytochrome b et l'ubiquinone.

Le taux de production d' H_2O_2 par les mitochondries isolées dépend de leur statut métabolique ou état respiratoire (Chance et coll., 1979). Les découplants ont donc eux aussi un effet sur la production de ROS. En absence d'inhibiteurs, les découplants augmentent le flux d'électrons à travers la chaîne respiratoire, diminuent ainsi l'état de réduction des complexes respiratoires et inhibent alors la production de ROS à l'état 2 (Boveris et Chance, 1973). Les effets des découplants sont inversés en présence d'inhibiteurs qui bloquent le flux important d'électrons au niveau des sites de production.

Ces différentes conditions altérant le rendement de l'oxydation phosphorylante permettent d'étudier avec précision le fonctionnement particulier des complexes de la chaîne respiratoire dans des conditions variées de sollicitations. Ils nous permettront d'aborder les mécanismes de production radicalaire à l'exercice.

3 Stress oxydant et activité physique : quand l'activité de la chaîne respiratoire s'accélère

3.1 Stress oxydant et fonctionnement musculaire à l'exercice

En s'appuyant sur les travaux généraux de (Commoner et coll., 1954) montrant que le muscle avait la capacité de produire des radicaux libres, les premières études sur l'activité physique réalisées dans la fin des années 70 ont principalement montré que l'exercice était associé à la formation de produits de la réaction des espèces radicalaires avec leur environnement direct. La première étude recensait sur le sujet fut publiée dans une revue vétérinaire et s'intéressa à la réponse rapide à l'exercice de la glutathion reductase d'érythrocytes équins (Brady et coll., 1977).

Dans les années suivantes, de nombreuses études firent alors le constat que l'activité physique augmentait ainsi considérablement la production d'oxydants au niveau tissulaire (Brady et coll., 1979, Davies et coll., 1982, Dillard et coll., 1978, Jackson et coll., 1985, Reid et coll., 1993). Dans la majorité de ces études, la surproduction de ROS estimée principalement par l'évaluation des dommages oxydants au cours de l'exercice ne semble pas entraîner nécessairement un stress oxydant systémique ou musculaire (Duthie et coll., 1990, Margaritis et coll., 1997). En effet, grâce à une signalisation cellulaire rapide, plusieurs études relèvent une augmentation associée du système de défenses antioxydantes enzymatiques, permettant de maintenir l'homéostasie redox de l'organisme (Lawler et coll., 1993, Powers et Lennon, 1999).

3.1.1 Les bases de l'étude du stress oxydant à l'exercice

De manière incontestable l'activité physique est associée de longue date à une augmentation de la consommation d'oxygène (VO_2) particulièrement par le muscle mais par l'organisme entier en général (Astrand et Ryhming, 1954).

A partir de cette constatation et des études pionnières (Chance et coll., 1979, Loschen et coll., 1971) qui montrèrent que la formation d'anion superoxyde par la mitochondrie était directement proportionnelle à son utilisation en oxygène et qu'à chaque fois que 25 molécules d'oxygène étaient consommées par la respiration, une molécule radicalaire était produite. De nombreuses études ont fait le lien entre l'exercice physique, l'augmentation de la

consommation d'oxygène et la production de radicaux libres dans un grand nombre de tissus (Alessio et coll., 1988, Davies et coll., 1982, Venditti et coll., 1999). Il persiste à ce jour que l'accélération du flux des réactions oxydatives au travers la chaîne respiratoire mitochondriale semble être la principale source de production accrue de ROS. L'ensemble des effets négatifs sur les tissus de ces ROS produits au cours de l'activité physique a relié l'exercice à la genèse d'un stress oxydant (Jenkins, 1988).

En 1978, Dillard et coll. publient la première étude chez l'homme sur les dommages de la structure lipidique à l'exercice. Ils font apparaître lors d'un exercice modéré (50% de la consommation maximale d'oxygène (VO_{2max})) une augmentation de la quantité de pentane expiré, index de la peroxydation lipidique (Dillard et coll., 1978). Quelques années plus tard, la mesure chez l'homme des TBARS sérique révèle une augmentation de cet index dès la fin de l'exercice avec un pic après 6h de récupération. Les sujets ne retrouvant leur valeur de repos que 72h après la fin de cet exercice. Les sujets ayant des taux de TBARS élevés ont aussi, au niveau sérique, des taux élevés de Créatine Kinase, Lactate Déshydrogénase et d'aspartate aminotransférase (Maughan, 1986).

En 1988, Kanter et coll. montrent que l'augmentation sérique post exercice de ces enzymes, largement acceptée aujourd'hui comme marqueur des dommages protéiques tissulaires, est étroitement corrélée avec une augmentation de la peroxydation lipidique à la suite d'un 80 km réalisé à 70% de VO_{2max} (Kanter et coll., 1988). Dans une étude plus récente, réalisée chez des triathlètes très entraînés, l'étude du stress oxydant ne montre aucune modification de peroxydation lipidique ni de contenu en glutathion à la suite de l'exercice (Margaritis et coll., 1997).

Ces quelques exemples, révèlent qu'il est difficile d'évaluer le stress oxydant à partir des seuls marqueurs indirects. De nouvelles études avec les marqueurs existants ne feraient que renforcer les disparités de résultats. En effet l'apparition d'un stress oxydant à l'exercice dépend étroitement des facteurs relatifs aux propriétés même de l'exercice tels que la nature, l'intensité ou la durée mais aussi à l'âge, le genre et le niveau d'entraînement des sujets étudiés. Dans le cadre de notre travail, nous avons choisi de nous focaliser sur les effets de l'activité physique sur les adaptations fondamentales des tissus musculaires squelettiques et hépatique sur un modèle animal. L'étude sur les rats permettant de s'affranchir au maximum des variabilités interindividuelles.

Il semblerait nécessaire dans les études ultérieures que l'ensemble des paramètres influençant le stress oxydant ; production de ROS, systèmes de défenses et dommages cellulaires, soit mesurer pour aider à la compréhension de son effet sur l'organisme.

3.1.2 Réponse musculaire à l'exercice unique

3.1.2.1 *Dommages et défenses musculaires et l'exercice unique*

En 1979, une première étude sur le rat montre qu'un des paramètres du stress oxydant, les TBARS, est augmenté dans le muscle à la suite d'un exercice exhaustif de natation. Ils montrent aussi que les valeurs de cet index sont beaucoup plus élevés 24h après la fin de l'exercice (Brady et coll., 1979). En 1999, Khanna et coll. observent l'évolution de deux paramètres. Ils révèlent une augmentation dans le muscle de la peroxydation lipidique à la suite d'un exercice exhaustif sur tapis roulant (30 m/min et pente de 10%) et observent que le contenu en glutathion totale et l'activité GPx sont inchangés au niveau musculaire (Khanna et coll., 1999). La même année, Bejma et coll. montrent que chez des rats âgés de 8 mois, un exercice modéré (25m/min, pente de 5% soit ~75% VO₂max) induit une augmentation de la peroxydation lipidique sans modification de niveau de protéines carbonylés. Ils observent en parallèle une diminution du rapport GSH/GSSG en faveur d'une augmentation du contenu en GSSG (Bejma et Ji, 1999).

Dans les études plus récentes, du fait de la mesure délicate des ROS liée à leurs instabilités (temps de demi-vie extrêmement court : 10⁻⁹ - 10⁻⁶ s), de nombreux travaux n'utilisent encore, chez l'homme et l'animal, que la mesure de deux paramètres. Ainsi, une élévation des dommages oxydants dans le muscle est observée à la suite d'un exercice de sprint (Kayatekin et coll., 2002). Les auteurs attribuent ces dommages oxydants à une augmentation de la concentration en lactate, induisant la production du radical hydroxyle via la réaction de Fenton (Ali et coll., 2000). Au niveau des défenses antioxydantes, ils montrent en accord avec les principaux résultats de la littérature que l'activité de la SOD et de la GPX n'est pas affectée par l'exercice de type sprint (Tableau 2).

A) Muscle Squelettique

Groups	SOD (U·mg ⁻¹ protein)	GPx (U·mg ⁻¹ protein)	TBARS (nmol mg ⁻¹ protein)
Control	8.11 (0.51)	0.07 (0.01)	0.39 (0.04)
0 h	6.99 (0.50)	0.07 (0.01)	0.27 (0.03)
0.5 h	7.36 (0.75)	0.05 (0.01)	0.74 (0.01)*
3 h	7.36 (0.50)	0.06 (0.01)	0.84 (0.04)*
24 h	8.77 (0.98)	0.06 (0.01)	0.46 (0.04)

Tableau 2 : Activités enzymatiques de la SOD et de la GPx et niveau de TBARS.

Les mesures sont réalisées dans le muscle squelettique (A) chez des souris sacrifiées par dislocation immédiatement (0h), 0,5h, 3h et 24h après un exercice intermittent sur tapis roulant. Les animaux contrôles sont tués sans exercice. * $P < 0,05$ vs contrôle (Adapté de (Kayatekin et coll., 2002)).

L'ensemble de ces études, et de façon illustrative l'étude de Kayatekin en 2002, font apparaître que l'augmentation des dommages oxydants, sans modifications importantes des systèmes de défenses, semble être liée principalement à une production accrue d'espèces radicalaires au cours et au décours de l'exercice.

3.1.2.2 Production radicalaire musculaire et exercice unique

Au cours de l'exercice physique intense ou maximale, la consommation d'oxygène au niveau des muscles périphériques augmente grâce à l'augmentation du débit sanguin et de la différence artério-veineuse. En admettant que la fraction d'O₂ réduit en O₂⁻ au niveau de la mitochondrie reste la même (1-3%), l'augmentation de la consommation d'oxygène, liée à l'intensité et la durée de l'exercice, provoque une élévation proportionnelle du débit de production du radical superoxyde mitochondrial (Davies et coll., 1982 , Jenkins, 1988, Sjodin et coll., 1990).

Quatre ans après les premières études de Dillard réalisées chez l'homme, c'est Davies et coll. (1982) qui montrent les premiers, en mesure directe chez le rat, une forte production musculaire de radicaux libres libérés lors d'un exercice d'intensité élevé sur tapis roulant. Pour évaluer ce paramètre, ils utilisent la résonance électronique de spin (RES) et observent une augmentation de l'amplitude du signal EPR (Electron Paramagnetic Resonance) de +81% par rapport au repos (Figure 20).

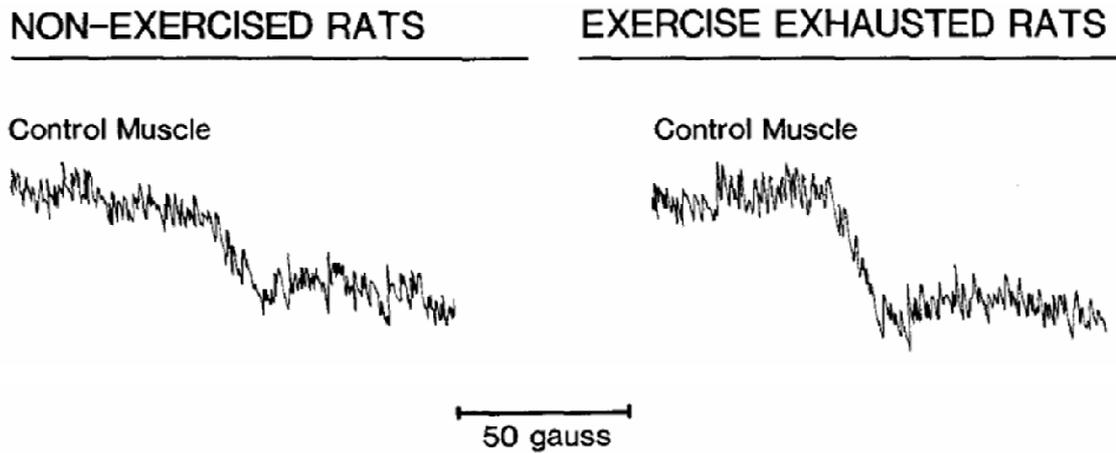


Figure 20 : Illustration du signal de radicaux libres observé par EPR dans des homogénats de muscle de rats au repos et à la suite d'un exercice exhaustif d'endurance sur tapis roulant

(Davies et coll., 1982)

Les années suivantes, d'autres études ont mesurés à l'exercice les effets des radicaux libres. De manière analogue aux études pionnières du laboratoire du Pr Packer à Berkeley, une stimulation électrique prolongée des muscles de rat provoque une augmentation de +70% du signal RES (Résonance Electronique de Spin), objectivant à nouveau de façon quantitative l'augmentation des concentrations en radicaux libres suite à un exercice (Jackson et coll., 1985). Ces derniers rapportent que la formation de radicaux libres mitochondriaux est plus élevée lors de contractions isométriques et concentriques comparées aux contractions excentriques. Cette observation serait en relation étroite avec une moindre consommation d'O₂ enregistrée lors d'exercices excentriques. Il faudra attendre une dizaine d'années pour trouver une étude portant sur la libération d'anion superoxyde par le muscle en contraction pour apporter des informations précises sur la nature des espèces radicalaires produites au cours de l'exercice (Reid et coll., 1992).

Nous avons pu voir dans la partie précédente que la régulation de la respiration mitochondriale influence de façon importante la production de ROS. En effet, la production d'O₂⁻ apparait plus faible en état 3, c'est-à-dire lorsque la respiration est stimulée avec de l'ADP, par rapport à l'état 4 reflétant l'état de base sans stimulation aucune de la respiration mitochondriale (Chance et coll., 1979). Sur cette base, la production mitochondriale d'O₂⁻ au cours de l'exercice serait donc plus faible que celle observée au repos. Il est suggéré qu'une modification au niveau des cytochromes, au cours de l'exercice, participerait à la réduction de la fuite d'électrons au niveau de la chaîne de transport, et donc à la réduction de la production de ROS (Papa et coll., 1997). De plus, la mitochondrie possède un système enzymatique

antioxydant très efficace à l'exercice, représenté par la MnSOD, permettant de limiter la cascade en chaîne de production des ROS à partir du radical superoxyde (Jackson et al., 2000).

Il persiste de nombreux débats sur les effets de la modification de l'état respiratoire au cours de l'exercice sur la production de ROS par la mitochondrie. Certaines données indiquent qu'au cours de l'activité contractile de type aérobie, les mitochondries de muscle sont de façon prédominante à l'état 3 respiratoire, ce qui limiterait la production de ROS au cours de la contraction (Di Meo et Venditti, 2001, Herrero et Barja, 1997). Di Meo et coll. ajoutent comme hypothèse que l'augmentation de température au cours de l'exercice pourrait elle aussi favoriser le découplage mitochondrial et la baisse de la production de ROS. De nombreuses études ont mis en évidence que l'exercice intense pourrait favoriser, par hyperthermie et altération de la membrane interne, un découplage mitochondrial favorisant une production accrue de radicaux libres (Davies et coll., 1982, O'Neill et coll., 1996, Salo et coll., 1991).

En 1999, une étude utilisant la même technique de fluorescence que Reid et coll. en 1992, montre sur des homogénats de muscle, que les variations de fluorescence, index de la production de ROS, sont fortement liées à une augmentation de production d'espèces radicalaires (+ 38%) à l'état basal en présence de substrat du complexe I. Ces auteurs ne relèvent aucune variation à l'état 3 sur les homogénats musculaires. Néanmoins de façon assez contradictoire avec les études précédentes, cette technique ne fait apparaître sur mitochondrie aucune différence de production à l'état basale et une augmentation à l'état 3 respiratoire. Ces derniers expliquent que les effets de l'exercice sur la production de ROS ont une courte durée et seraient largement diminués pendant le temps d'isolement des mitochondries (Bejma et Ji, 1999).

En 2006, Molnar et coll. montrent qu'un exercice excentrique induit une diminution de la production de ROS et semblent attribuer cet effet principalement à une baisse d'activité du complexe I et en une modification de perméabilité de la membrane mitochondriale. Cette modification de perméabilité serait à l'origine d'un léger découplage mitochondrial inhibant alors le flux inverse d'électrons vers le complexe I considéré comme la principale voie de production radicalaire (Molnar et coll., 2006).

Ainsi s'il est définitivement reconnu que la consommation d'oxygène augmente proportionnellement avec l'intensité de l'exercice (Astrand, 1994), l'hypothèse d'une

augmentation de la production de ROS mitochondriale au cours de l'exercice reste très largement controversée.

Les principales théories mises en avant dans cette partie sur le muscle, comme le fait que les mitochondries sont la source majeure de production de ROS à l'exercice et que ces espèces radicalaires sont potentiellement dommageables pour l'organisme, apparaissent comme ayant été découvertes et formulés dans les quelques premières études (Davies et coll., 1982, Dillard et coll., 1978) et restent des références incontestées aujourd'hui.

Il ressort avec évidence que le muscle squelettique produit différentes variétés de ROS que ce soit au repos ou à l'exercice au travers de processus régulés. Les premières études suggèrent que la production importante de ROS par la chaîne respiratoire mitochondriale apparaît de façon dommageable et accidentelle ou comme des déchets relatifs à la production énergétiques. Les études récentes contestent ce rôle néfaste et s'orientent davantage vers la compréhension des mécanismes et stimuli métaboliques qui régulent une production « contrôlée ». Il apparaît que cette production de ROS mitochondriale serait un messenger nécessaire à l'optimisation des fonctions cellulaires à l'exercice mais aussi dans de nombreux états pathologiques.

Dans une étude récente, il est montré que le facteur de transcription NF- κ B, impliqué dans la régulation redox, est exprimé de façon maximale deux heures après la fin d'un exercice modéré sur tapis roulant (25m/min, 5%, 60min). Cette étude relève alors le lien probable entre cette activation retardée et un signal radicalaire (Ji et coll., 2004).

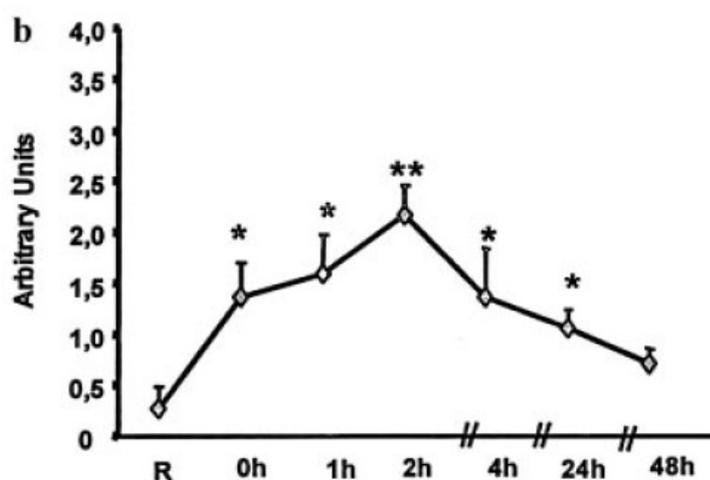


Figure 21: Activation du facteur de transcription NF- κ B sur extrait nucléaire de muscle gastrocnémien de rats au repos ou à 0h, 1h, 2h, 4h, 24h, 48h après un exercice exhaustif (~ 60 min, 25 m/min, pente 5%) sur tapis roulant.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, vs. repos (Adapté de Ji et coll., 2004).

L'ensemble des modifications de dommages ou de signalisation induites par le stress oxydant observé de façon optimale après 2-3h de récupération post-exercice serait-il corrélé à une augmentation dans les mêmes délais de la production mitochondriale de ROS ? Pourrait-on voir en cela un processus de signal pour une adaptation à l'exercice chronique ?

3.1.3 Réponse musculaire et activité physique chronique

L'exercice physique régulier est un moyen naturel pour prolonger la santé et décroître l'incidence de nombreuses maladies (Holloszy et Booth, 1976, Radak et coll., 2000). L'exercice physique peut aussi, selon l'intensité et la durée, modifier le statut redox cellulaire en augmentant la production de radicaux libres et l'activité des systèmes antioxydants. Le taux de consommation d'O₂ au cours de l'exercice peut augmenter de 10 à 15 fois au niveau de l'organisme et de plus de 100 fois au niveau musculaire (Astrand et coll., 1986). Cette observation suggère que l'exercice physique régulier résultant en une augmentation de la consommation d'oxygène devrait générer potentiellement plus de stress oxydant. Les résultats eux montrent que l'exercice régulier engendre majoritairement une régulation négative de la production de ROS (Itoh et coll., 1998, Radak et coll., 2004, Venditti et coll., 1999).

3.1.3.1 *Dommages et défenses musculaires et exercice chronique*

Tandis que la majeure partie des études sur l'entraînement en endurance révèle une augmentation de l'activité totale de la SOD (Criswell et coll., 1993, Higuchi et coll., 1985, Jenkins, 1988, Leeuwenburgh et coll., 1994, Oh-ishi et coll., 1997, Powers et coll., 1993) quelques études suggèrent que l'entraînement en endurance ne modifie pas l'activité de cette enzyme antioxydante dans le muscle (Alessio et Goldfarb, 1988, Ji et coll., 1988, Laughlin et coll., 1990).

A la fin du 20^{ème} siècle des études montrent que le type d'entraînement, par intervalle ou continu, engendre des adaptations variables des activités antioxydantes. Chez l'homme les auteurs ne révèlent pas de différence d'activité SOD et observent cependant que l'activité GPx est augmentée uniquement au niveau du soléaire après un entraînement par intervalles. Chez le rat, les auteurs montrent que l'entraînement en endurance n'induit pas de modification du rapport GSH/GSSG (Criswell et coll., 1993, Itoh et coll., 1998).

Sur le versant des dommages, un entraînement de 9 semaines en natation ne fait apparaître aucune différence de peroxydation lipidique et de dégradation protéique. Cependant l'entraînement induit un effet bénéfique sur les dommages de l'ADN (8-OHdG) qui sont réduits de 30% (Radak et coll., 1999). Dans les mêmes conditions d'entraînement, les taux de dérivés carbonylés dans le muscle, index d'une dégradation protéique sont augmentés (Radak et coll., 2000). Les mitochondries révèlent un taux de dégradation protéique supérieur au cytosol qui n'est lui pas affecté par l'entraînement (Radak et coll., 2000). Ces résultats corroborent avec l'hypothèse que la mitochondrie serait la principale source de ROS à l'exercice mais aussi la principale cible.

De nombreuses études ont montré une augmentation des activités SOD, GPx, CAT suite à un entraînement en endurance chez le rat (Hollander et coll., 2000, Jenkins, 1993, Leeuwenburgh et coll., 1997, Meydani et coll., 1992, Powers et coll., 1994)

Sur une souche de rat exprimant une importante activité volontaire spontanée (Lou/C), un entraînement sur roue de 5 mois ne provoque pas de modification d'activité de la SOD mais augmente celles de la GPx et de la CAT. Les auteurs ne révèlent aucune modification du niveau de peroxydation lipidique entre les groupes (Servais et coll., 2003).

Un entraînement en endurance de 13 semaines sur tapis roulant induit chez le rat une augmentation de toutes les enzymes antioxydantes excepté la Cu,Zn-SOD cytosolique. Les activités de CAT et GPx sont augmentées d'environ 30% et l'activité de MnSOD est multipliée par plus de 2 fois. Dans cette étude l'entraînement induit également une augmentation de la peroxydation lipidique (Lambertucci et coll., 2007).

L'ensemble de ces résultats les plus significatifs montrant une importante peroxydation lipidique à la suite de l'entraînement, malgré des contenues élevées en enzymes antioxydantes, laisse présager une production radicalaire supérieure dans les groupes entraînés.

3.1.3.2 Production radicalaire de mitochondries musculaires et exercice chronique

Peu d'études se sont intéressées à la mesure directe des effets d'un entraînement chronique sur la production radicalaire musculaire.

Itoh et coll. en 1998, mesurent la production du radical Hydroxyl (OH⁻) en mesurant la réduction de l'acide salicylique ou 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA). À la suite d'un entraînement modéré (3 semaines, 20 m/min), ils observent un niveau musculaire trois fois plus faible de 2,3-DHBA par rapport à un groupe contrôle (Itoh et coll., 1998).

Dans une étude sur le rat, un entraînement en endurance de natation (10 semaines, 5 jours/sem.) ne modifie pas la respiration mitochondriale à l'état 3 ou à l'état 4 dans le muscle (Venditti et coll., 1999). Cependant la production d'H₂O₂ à l'état 4 est significativement plus faible dans le groupe entraîné lorsqu'elle est rapportée à la consommation d'oxygène. En absence de modification des capacités antioxydantes suite à l'entraînement, Venditti et coll. semblent attribuer ces différences à une modification du potentiel de membrane qui est reconnue pour faire baisser la production d'H₂O₂ (Korshunov et coll., 1997). Ils mettent en avant un rôle probable des UCP, transporteurs présents sur la membrane mitochondriale interne, qui ont la propriété d'augmenter la conductivité aux protons résultant en une forme de découplage de la chaîne respiratoire.

Dans une étude réalisée en 2003, l'activité volontaire sur roue de 5 mois ne modifie pas la production mitochondriale de ROS exprimée par quantité de mitochondries. Cependant lorsque les auteurs reportent la production de ROS à la consommation d'oxygène, ils observent une diminution par deux de la production dans le groupe entraîné par rapport au contrôle, à l'état 2 respiratoire lorsque la mitochondrie est alimentée avec du succinate (Servais et coll., 2003). Récemment une étude révèle aussi une production de ROS inférieure suite à un entraînement excentrique sur tapis roulant (Molnar et coll., 2006).

Cette partie de littérature sur le muscle à l'entraînement révèle les paradoxes qui persistent dans les études sur le stress oxydant. En effet on voit apparaître des augmentations de dommages oxydants en parallèle d'une augmentation des défenses et d'une diminution de la production mitochondriale de ROS.

3.2 Stress oxydant et fonctionnement hépatique à l'exercice

3.2.1 Rôle du foie dans le métabolisme

Les organismes vivants doivent adapter continuellement leur métabolisme à l'environnement nutritionnel car la quantité et la qualité des nutriments disponibles varient au cours du temps. Ceci est particulièrement vrai pour le glucose qui est utilisé en permanence chez les mammifères par certains organes ou tissus alors que les apports sont discontinus. La disponibilité continue en glucose est assurée principalement par le foie. En effet, contrairement à la glycolyse qui se déroule dans toutes les cellules vivantes, la gluconéogenèse a lieu principalement au niveau du foie et du cortex rénal ou encore au niveau de l'intestin grêle avec la démonstration de la présence de glucose 6-phosphatase dans ce tissu (Croset et coll., 2001). La gluconéogenèse est un processus consommateur d'énergie. En effet, 6 molécules d'ATP sont requises, par exemple, pour synthétiser une seule molécule de glucose à partir d'hydrates de carbone comme le pyruvate ou le lactate. En situation de jeûne, la majeure partie de l'énergie nécessaire à cette voie provient généralement de l'oxydation hépatique des acides gras par l'intermédiaire de la β -oxydation mitochondriale. De fait, alors qu'il ne constitue que 2% du poids corporel, il représente à lui seul 20% de la dépense énergétique totale de repos d'un individu. Ceci est dû à son activité métabolique intense, puisqu'il joue un rôle dans le métabolisme énergétique des autres organes en stockant, produisant et exportant des substrats énergétiques. Le foie joue donc un rôle central dans le maintien de l'homéostasie glucidique en se basant sur un métabolisme aérobie important (Winder, 1985). Cette activité métabolique est accentuée en conditions d'exercice.

De plus, le foie est soumis à des phénomènes locaux d'ischémie-reperfusion suite à une redistribution de la masse sanguine qui pourraient engendrer des situations d'hypoxie localisée. Ces phénomènes font du foie un candidat à l'exposition à un stress oxydant significatif au cours de l'exercice.

3.2.2 Exercice et fonctionnement hépatique

De nombreuses études ont démontré que l'exercice avait des effets bénéfiques sur les fonctions hépatiques (Ritland, 1988). L'entraînement en endurance est reconnu pour augmenter le profil métabolique, incluant la réduction des triglycérides plasmatiques et

l'élévation du cholestérol HDL (Gorski et coll., 1990). L'entraînement mène à une réduction de la néoglycogénèse et a un effet d'épargne du glycogène au cours de l'exercice (Podolin et coll., 1994). En premier lieu, l'entraînement favorise l'oxydation des acides gras au niveau musculaire comme substrat énergétique au cours de l'activité. En limitant la glycolyse, il facilite le maintien d'une glycémie normale, favorise l'homéostasie glucidique et épargne le glycogène hépatique (Donovan et Sumida, 1997). La sécrétion d'hormone de croissance en réponse à son facteur hypothalamique est spécialement augmentée par l'activité physique de résistance. L'hormone de croissance régule dans le foie au cours de l'entraînement l'expression de l'ARNm du facteur de croissance mimant l'insuline (IGF-1 : insulin-like Growth Factor) (Zanconato et coll., 1994). L'entraînement régule aussi dans le foie les enzymes antioxydantes et réduit les dommages oxydants (Venditti et Di Meo, 1996, 1997). L'entraînement en endurance induit une augmentation dans le foie du contenu en coenzyme Q, en cytochromes b, c+c1 et a+a3 et en cytochrome c oxydase (Quiles et coll., 2001). Ce fait est étonnant car le foie est sujet à une diminution substantielle en apport en oxygène au cours de l'exercice (Astrand et coll., 1986). L'augmentation de ses composants mitochondriaux semble être liée à une meilleure mobilisation des nutriments.

Les réponses adaptatives du foie à l'entraînement régulier incluent de façon prépondérante une augmentation de la capacité gluconéogénique hépatique suggérant des modifications du niveau métabolique du foie (Turcotte et Brooks, 1990). A ce jour, peu d'études se sont intéressées aux effets de l'exercice et en particulier de l'entraînement en endurance sur la production de ROS par cet organe au rôle majeur pour l'organisme (Itoh et coll., 1998, Radak et coll., 2004, Venditti et coll., 1999).

3.2.3 Dommages et défenses hépatiques et exercice chronique

Tout a commencé en 1979. Brady et coll. sont les premiers à montrer dans une étude sur le rat que les TBARS sont augmentés dans le foie à la suite d'un exercice exhaustif de natation. Ils montrent que ces effets sont cependant transitoires par rapport au muscle (Brady et coll., 1979).

A partir de marqueurs du stress oxydant, il semble que le foie soit le principal organe capable de réduire le stress oxydant à la suite d'un entraînement en endurance (Itoh et coll.,

1998). En effet, on peut noter une augmentation du niveau de base en glutathion réduit (GSH) associée à une tendance à la baisse du niveau de base des radicaux hydroxyles.

Venditti et coll. (1999) montrent un niveau de peroxydation lipidique stable après un exercice à basse intensité pendant une durée modérée suggérant que ce type d'effort n'est pas un facteur d'induction de stress oxydant dans le foie. Radàk et coll. (2004) montrent tout de même que le stress oxydant induit par l'âge sur le tissu hépatique est atténué par l'entraînement en endurance. En effet, en se basant sur les marqueurs de la peroxydation lipidique (MDA), ils estiment que la production de ROS avec l'entraînement diminue d'environ 10 %. Cette diminution de production de ROS liée à l'exercice est confirmée par l'augmentation du niveau de GSH et du rapport GSH/GSSG dans le foie. De plus, l'entraînement en endurance provoque une augmentation de l'activité SOD et de la GPX (Thirunavukkarasu et coll., 2003).

Kayatekin et coll. en 2002 ne révèlent aucune modification de la peroxydation lipidique ni du statut antioxydant suite à un exercice unique au niveau hépatique. En 2005, Venditti réétudient le foie et observent chez le rat une augmentation du niveau de peroxydation lipidique et de protéines carbonylés suite à un exercice exhaustif de natation.

Ogonovszky et coll. en 2005 montrent dans une étude réalisée chez le rat, que l'entraînement modéré (natation 1h/jour, 5jour/semaines, 8 semaines) induit une diminution significative du contenu hépatique en protéines carbonylés sans affecter la peroxydation lipidique. L'entraînement intensif (la durée d'entraînement est augmenté de 30min par semaine jusqu'à atteindre 4h30 par jour la dernière semaine) n'induit aucune modification de ces paramètres. Le surentraînement provoqué par une augmentation soudaine du volume d'exercice (augmentation brutale à 4h30 les 2 dernières semaines) induit des dommages au niveau de l'ADN nucléaire hépatique sans agir sur la peroxydation lipidique ni la dégradation protéique.

Une étude récente montre qu'un exercice unique de natation mais aussi un entraînement de 8 semaines révèlent une augmentation de la peroxydation lipidique et des dérivés carbonylés au niveau hépatique. En parallèle le taux de GSH est diminué et conjugué à une augmentation d'activité de GPx et une baisse de la GR (Glutathion Reductase) (Aydin et coll., 2007).

L'ensemble de ces travaux, basés sur l'analyse de marqueurs indirects suggère des adaptations variables du foie à l'exercice liées à la diversité des protocoles. Ces résultats sur le tissu hépatique sont sans doute le reflet d'une variation de production de ROS mitochondriale à l'exercice.

3.2.4 Production radicalaire hépatiques et exercice

Dans le domaine de l'exercice, les études sur les effets de l'entraînement en endurance sur la production radicalaire ont surtout porté sur le muscle. Quelques études ont cependant mis l'accent sur l'importance d'étudier les mécanismes de gestion du stress oxydant dans différents organes et notamment le foie qui est impliqué dans le maintien de l'homéostasie glucidique et plus généralement dans la coordination du métabolisme énergétique au cours de l'exercice prolongé (Itoh et coll., 1998, Ogonovszky et coll., 2005, Radak et coll., 2004). A ce jour, l'étude dans le foie de la production radicalaire mitochondriale en réponse à l'exercice a été largement négligée.

En utilisant la résonance électronique de spin (RES), Davies et coll. montrent chez le rat, que la majorité des ROS à l'exercice proviendraient de la production hépatique avec une production augmentée de +135% par rapport au repos contre +81% pour le muscle (Davies et coll., 1982). Les années suivantes, les études réalisées sur des homogénats de foie ne révèlent pas d'effet de l'entraînement en endurance sur la production de ROS (Itoh et coll., 1998), ni de l'exercice exhaustif (Bejma et coll., 2000, Itoh et coll., 1998).

Ces différentes études sur le stress oxydant au niveau hépatique révèlent des informations éclectiques. L'apparition de dommage dans certains cas pourrait placer la chaîne respiratoire comme une source potentielle de production de ROS à l'exercice. Malgré le fait que le foie se retrouve au cours de l'exercice en ischémie partielle de part la redistribution des apports sanguins. Au vu des modifications de l'homéostasie redox observé au cours de l'exercice, il semble que suffisamment d'oxygène soit disponible pour interagir avec les protéines réduites de la chaîne respiratoire et augmenter la production de ROS. De plus, le foie « hypoxique » est soumis à la fin de l'exercice, à un retour du flux sanguin qui mène au mécanisme de réoxygénation. Cela mime alors le phénomène d'ischémie-reperfusion, qui est aujourd'hui largement reconnu pour induire une production importante de radicaux libres (Honda et coll., 2005).

Dès lors, il apparaît intéressant d'étudier les répercussions de l'exercice et de l'entraînement en endurance sur les sites mitochondriaux de production des ROS au niveau hépatique. Cela de façon à préciser les effets spécifiques de l'entraînement sur chacun des complexes de la chaîne respiratoire producteurs de ROS dans ces conditions.

Les bienfaits de l'exercice sur la santé résideraient dans la régulation à la hausse des systèmes antioxydants et la réduction de la production d'oxydant (Leeuwenburgh et Heinecke, 2001). Aujourd'hui, par leurs implications dans les mécanismes de signalisation cellulaire, les ROS pourraient révéler un rôle majeur dans les adaptations mitochondriales à l'exercice.

Les informations de ces dix dernières années (1997-2007) concernant les paramètres du stress oxydant induit par l'activité physique sont résumées dans les tableaux ci-dessous (Tableau 3 et Tableau 4).

<i>Exercice Aigu</i>			
	Muscle	Foie	Coeur
<i>Dommmages oxydants</i>			
Péroxydation lipidique	↗ (Voces, 2004)	↗ (Aydin, 2005)	↗ (Aydin, 2005)
	⇒ (Molnar, 2006)	⇒ (Alessio, 2005)	⇒ (Alessio, 2005)
	↗ (Bejma, 1999)	↗ (Liu, 2000)	⇒ (Gul, 2006)
	↗ (Venditti, 2005)	⇒ (Bejma, 2000)	⇒ (Bejma, 2000)
		↗ (Venditti, 2005)	↗ (Venditti, 2005)
Protéines carbonylés	↗ (Perez, 2003)	⇒ (Bejma, 2000)	↗ (Perez, 2003)
	⇒ (Bejma, 1999)	↗ (Aydin, 2005)	↗ (Aydin, 2005)
	↗ (Venditti, 2005)	↗ (Venditti, 2005)	⇒ (Bejma, 2000)
			↗ (Venditti, 2005)
<i>Défenses antioxydantes</i>			
CAT	⇒ (Molnar, 2006)		⇒ (Gul, 2006)
SOD	↗ (Hollander, 2001) (48h après)		
	⇒ (Molnar, 2006)		
GPx	⇒ (Molnar, 2006)	↘ (Bejma, 2000)	↗ (Aydin, 2005)
	⇒ (Venditti, 2005)	↗ (Aydin, 2005)	↘ (Gul, 2006)
		⇒ (Venditti, 2005)	⇒ (Bejma, 2000)
			⇒ (Venditti, 2005)
Ratio GSH/GSSG	↗ (Voces, 2004)	⇒ (Liu, 2000)	⇒ (Bejma, 2000)
	↘ (Bejma, 1999)	⇒ (Bejma, 2000)	
GR		⇒ (Bejma, 2000)	↘ (Aydin, 2005)
	⇒ (Venditti, 2005)	↘ (Aydin, 2005)	⇒ (Gul, 2006)
		↗ (Venditti, 2005)	⇒ (Bejma, 2000)
			↗ (Venditti, 2005)
Antioxydants non-enzymatique	⇒ (Venditti, 2005)	⇒ (Venditti, 2005)	↗ (Venditti, 2005)
<i>Production radicalaire mitochondriale</i>			
Substrat NADH	Etat 2	↘ (Molnar, 2006)	
		↗ (Bejma, 1999)	⇒ (Bejma, 2000)
		↗ (Venditti, 2007)	⇒ (Bejma, 2000)
	Etat 3	⇒ (Molnar, 2006)	
		↗ (Venditti, 2007)	
Substrat FADH2	Etat 2	⇒ (Molnar, 2006)	
		↗ (Venditti, 2007)	
	Etat 3	⇒ (Molnar, 2006)	
		↗ (Venditti, 2007)	

Tableau 3 : Tableau de synthèse des effets de l'exercice chronique sur le stress oxydant observés ces 10 dernières années.

Exercice chronique

	Muscle	Foie	Coeur
<i>Dommages oxydants</i>			
Péroxydation lipidique	↗ (Liu, 2000)	⇒ (Alessio, 2005)	↘ (Perez, 2003)
	↘ (Perez, 2003)	⇒ (Gunduz, 2004)	⇒ (Aydin, 2005)
	⇒ (Gunduz, 2004)	↗ (Aydin, 2005)	⇒ (Alessio, 2005)
	↗ (Molnar, 2006)	⇒ (Metin, 2002)	↘ (Husain, 2003)
	⇒ (Metin, 2002)	⇒ (Pey, 2003)	⇒ (Moran, 2004)
			↗ (Liu, 2000)
			⇒ (Gul, 2006)
			⇒ (Gunduz, 2004)
			⇒ (Metin, 2002)
Protéines carbonylés	⇒ (Perez, 2003)	↗ (Aydin, 2005)	⇒ (Perez, 2003)
		⇒ (Pey, 2003)	↗ (Ascensão, 2005)
			↗ (Aydin, 2005)
<i>Défenses antioxydantes</i>			
CAT	⇒ (Molnar, 2006)	⇒ (Pey, 2003)	⇒ (Ascensão, 2005)
			⇒ (Gul, 2006)
SOD	⇒ (Molnar, 2006)	↗ (Thirunavukkarasu, 2003)	⇒ (Ascensão, 2005)
		⇒ (Pey, 2003)	
GPx	⇒ (Molnar, 2006)	↗ (Aydin, 2005)	⇒ (Ascensão, 2005)
		⇒ (Pey, 2003)	↗ (Aydin, 2005)
Ratio GSH/GSSG	↗ (Ascensão, 2005)	↗ (Pey, 2003)	↗ (Ascensão, 2005)
		↗ (Radak, 2004)	
GR		↗ (Thirunavukkarasu, 2003)	⇒ (Ascensão, 2005)
		↘ (Aydin, 2005)	↘ (Aydin, 2005)
		⇒ (Pey, 2003)	↘ (Gul, 2006)
Antioxydants non-enzymatique			↗ (Perez, 2003)
Capacités antioxydantes globales	⇒ (Walsh, 2001)		⇒ (Ascensão, 2005)
			⇒ (Gul, 2006)
<i>Production radicalaire mitochondriale</i>			
Substrat NADH	Etat 2	↘ (Venditti, 1999)	⇒ (Marcil, 2006)
		↘ (Molnar, 2006)	
	Etat 3	⇒ (Molnar, 2006)	
		⇒ (Venditti, 1999)	
Substrat FADH2	Etat 2	↘ (Molnar, 2006)	⇒ (Marcil, 2006)
		↘ (Venditti, 1999)	
	Etat 3	⇒ (Molnar, 2006)	
		↘ (Venditti, 1999)	

Tableau 4 : Tableau de synthèse des effets de l'exercice aigu sur le stress oxydant observés ces 10 dernières années.

3.3 Activités physiques et biogenèse mitochondriale

3.3.1 Préambule

En accord avec la théorie originale sur le stress, à un stress chronique sans interruption, l'organisme répond par un dérèglement (réaction d'alarme), puis par une amélioration de sa résistance (étape de résistance) et se termine par son épuisement (étape d'épuisement) (Selye, 1956). Dans ce sens, les stress chroniques peuvent être très dangereux pour l'organisme si les périodes de repos régulières nécessaires à la récupération sont oubliés.

La théorie de « l'hormesis » basée sur ce premier postulat réside dans le fait que les systèmes biologiques répondent à l'exposition d'éléments chimiques, toxines ou radiation avec une courbe en cloche. En toxicologie, l'hormesis est un phénomène dose-dépendant caractérisé par une stimulation à basse dose et une inhibition ou dégradation à haute dose. Récemment, l'hormesis a été étendue à la science des radicaux libres. Il est proposé que l'exercice, source de stress oxydant, module la production de radicaux libres ainsi que leurs effets selon cette courbe théorique (Radak et coll., 2007).

Parmi les fonctions modifiées par le stress oxydant, on trouve la fonction mitochondriale avec une adaptation qui résulte du processus de biogenèse.

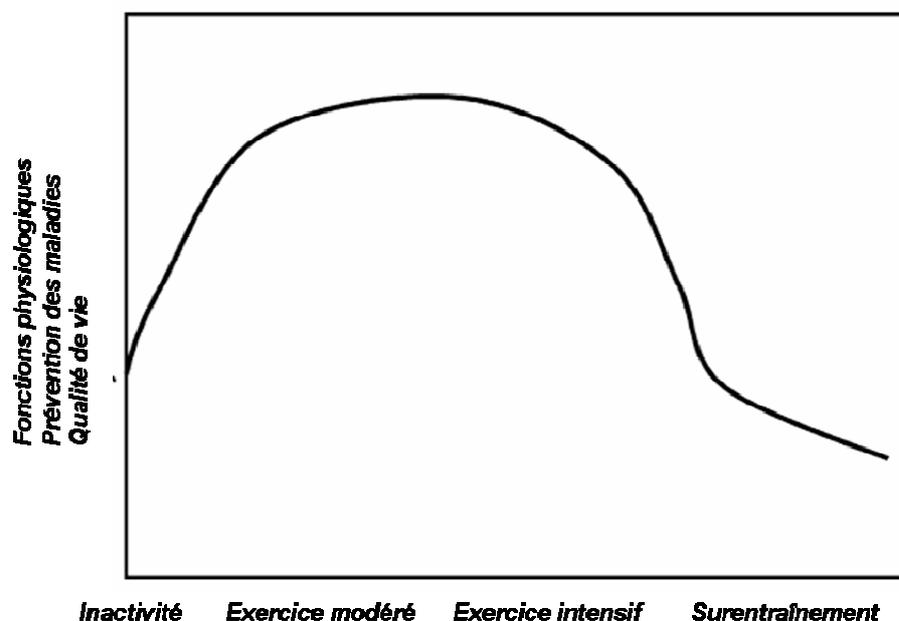


Figure 22 : Figure typique de la théorie d'Hormesis et des effets de l'exercice.

L'exercice modéré améliore les fonctions physiologiques de différents organes, améliore la lutte contre les maladies et améliore les qualités de vie. L'inactivité, le surentraînement et l'excès d'effort intensif augmentent les risques de maladies et perturbent les fonctions physiologiques (Radak et coll., 2007).

3.3.2 Activité physique chronique et biogenèse mitochondriale

Le muscle squelettique est un tissu extrêmement malléable capable de considérablement s'adapter d'un point de vue métabolique et morphologique, en réponse à une activité physique répétée. Une activité physique régulière est associée à une augmentation de la densité (Figure 23) et de l'activité enzymatique mitochondriale, regroupées sous le terme de biogenèse mitochondriale (Toledo et coll., 2006). En est-il de même pour le tissu hépatique ? Alors que beaucoup de travaux ont porté sur le tissu musculaire, très peu d'études ont été menées sur le foie et sa réponse à l'exercice chronique alors qu'il représente un organe essentiel au bon fonctionnement métabolique de l'individu.

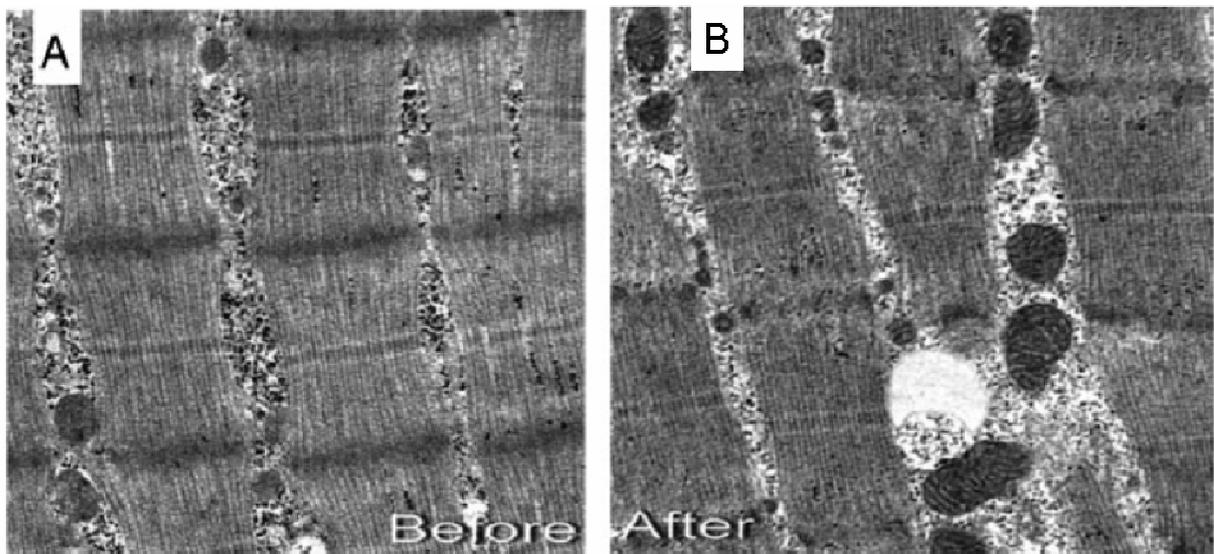


Figure 23 : Illustration de la biogenèse mitochondriale musculaire induite par l'entraînement.

(A) avant entraînement ; (B) après un entraînement modéré de 16 semaines (Adapté de (Toledo et coll., 2006)).

L'association entre activité physique et contenu mitochondrial est connu depuis plus de 75 ans (Needham, 1926). Les premières observations sur cette relation furent réalisées par comparaison entre des muscles de poulets ne volant que rarement et des muscles de pigeons volant régulièrement sur une période donnée. Ces études montrèrent que les muscles des pigeons avaient un contenu et une activité mitochondriale plus importante que ceux du poulet (Paul et Sperling, 1952). D'autres études ont montré que les muscles fonctionnant continuellement comme le muscle cardiaque avaient eux aussi plus de mitochondries.

Par la suite, les études sur l'exercice régulier réalisaient au début des années 70 font ressortir avec évidence que l'activité physique répétée augmente le contenu et l'activité mitochondriale. Une biogenèse mitochondriale est observée chez des rats âgés de 6 semaines

réalisant une activité physique, 5 jours par semaines pendant 3 mois, sur tapis roulant. A la fin de leur entraînement, les muscles squelettiques des rats exercés contiennent une concentration plus importante en cytochrome c et une activité supérieure des enzymes mitochondriales (Holloszy, 1967). D'autres études observent la même tendance chez l'homme (Gollnick et Ianuzzo, 1972, Hoppeler et coll., 1973).

Bien que ces phénomènes de biogenèse mitochondriale à la suite de l'exercice soient décrits depuis plusieurs années (Holloszy, 1967), le détail des mécanismes moléculaires à l'origine de ces adaptations reste encore à préciser. Ces connaissances semblent importantes pour comprendre les mécanismes généraux d'évolution de cet organite ainsi que la physiopathologie des maladies mitochondriales.

3.3.3 Hypothèses de régulation de la biogenèse

Dès les premiers instants d'activité physique, un grand nombre d'événements de régulations rapides se mettent en place. Ces derniers prennent part dans le processus de signal initial menant aux cascades protéiques et à la synthèse lipidique, nécessaires à une biogenèse mitochondriale. Ces changements incluent le flux de Ca^{2+} , le turnover de l'ATP et la stimulation de la consommation d'oxygène, génératrice d'espèces radicalaires.

3.3.3.1 Hypothèse calcique

Le calcium ionique (Ca^{2+}) est considéré comme étant un ion important dans les processus de signalisation dans le muscle squelettique mais aussi dans de nombreux autres tissus (Berchtold et coll., 2000, Clapham, 1995). Ainsi, le Ca^{2+} libéré par le réticulum sarcoplasmique au cours de la contraction musculaire pourrait jouer un rôle important dans la régulation de la biogenèse mitochondriale induite par l'activité physique chronique (Hood, 2001). Le calcium joue ainsi un rôle crucial dans la contraction musculaire mais aussi comme un messager secondaire intracellulaire capable d'induire de manière non stoechiométrique l'expression de protéines mitochondriales (Freysenet et coll., 2004). L'élévation de concentration de Ca^{2+} intracellulaire conduit à l'activation de protéines kinases et phosphatases sensibles au calcium, telles que la protéine kinase Ca^{2+} -calmoduline dépendante (CaMK), la protéine kinase C (PKC) et une phosphatase : la calcineurine. Il a ainsi été montré que l'inhibition de l'activité calcineurine par administration de cyclosporine A (CsA), un

inhibiteur spécifique, prévient l'hypertrophie musculaire et la conversion de typologie musculaire (Dunn et coll., 1999). Cependant la calcineurine ne semble pas impliquée dans les adaptations enzymatiques mitochondriales dans le muscle squelettique à la suite d'une activité chronique (Terada et coll., 2003).

3.3.3.2 Hypothèse des rapports énergétiques : ATP/ADP/AMP

Pour maintenir leur fonctionnement, les cellules des mammifères doivent conserver une balance énergétique positive et stable, caractérisée par un rapport ATP/ADP élevé (ratio 10/1). Dans les cellules musculaires, l'activité contractile est intimement liée à une accélération du turnover de l'ATP. L'augmentation de ce turnover résulte en une diminution du rapport ATP/ADP_{libre}. Selon l'ampleur de la demande énergétique et les capacités mitochondriales à régénérer de l'ATP, l'homeostasie énergétique peut être plus ou moins altéré. Un déséquilibre important en faveur du catabolisme énergétique augmente le contenu cellulaire en ADP_{libre} qui mène à une augmentation du contenu en AMP par l'action de l'adenylate kinase (Figure 24). Cette altération de statut énergétique typique dans le muscle à l'exercice, augmentant le rapport AMP/ATP, est accompagné d'une activation allostérique de l'AMP-activated protéine kinase (AMPK) (Bergeron et coll., 2001). L'AMPK peut être activée physiologiquement par une augmentation en AMP mais aussi pharmacologiquement par l'utilisation d'un analogue de l'adénosine (AICAR) (Winder et Hardie, 1999). Cet agent est ainsi régulièrement utilisé pour mimer les effets de l'activité physique chronique. Un traitement chronique avec de l'AICAR révèle une augmentation de l'activité musculaire de citrate synthase, succinate deshydrogénase et du contenu en cytochrome c (Winder et coll., 2000). Ceci place l'AMPK comme un candidat majeur dans la régulation des adaptations mitochondriales à l'exercice.

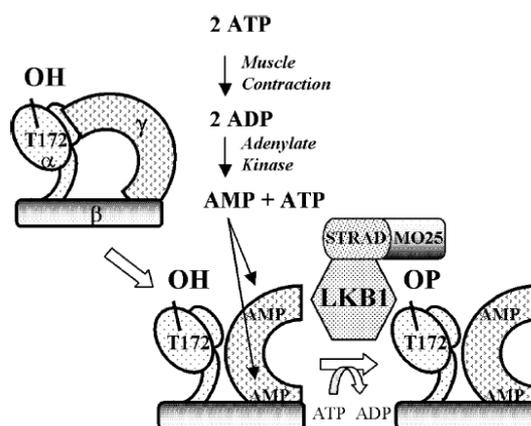


Figure 24 : Schéma d'activation de l'AMPK par l'AMP en réponse à la contraction musculaire.

(Winder et coll., 2006)

3.3.3.3 Hypothèse radicalaire

Nous avons vu que le stress oxydant et particulièrement l' H_2O_2 induit l'oxydation de résidus cystéines de protéines conduisant à des modifications de leurs fonctions permettant la modification fonctionnelle de facteurs de transcription (voir paragraphe 1.2.5.1)

De nombreux facteurs de transcriptions sont impliqués dans l'amorçage des adaptations physiologiques et métaboliques associés à l'expression des gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale. Ceux ci incluent : deux facteurs respiratoires nucléaires (NRF-1, NRF-2), deux récepteurs peroxisomiaux (PPAR- α , PPAR- γ), une protéine spécifique (Sp1) et le produit immédiat des gènes précoces (c-jun et c-fos). De façon illustrative, un stress oxydant induit par des lipopolysaccharides créé au niveau hépatique une biogenèse mitochondriale stimulée par NRF-1. La suppression de la production de ROS sur des cellules hépatiques en cultures est elle associée à une perte d'expression de NRF-1 (Suliman et coll., 2003). L'exercice, générateur potentiel de stress oxydant, pourrait-il lui aussi activer la biogenèse mitochondriale par un signal radicalaire ?

La découverte du coactivateur transcriptionnel appelé PPAR- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) par l'équipe de Spiegelman (Puigserver et coll., 1998) a fait émerger l'existence d'une molécule pilote dans le processus de biogenèse mitochondriale susceptible d'induire l'encodage protéique nucléaire et mitochondrial (Lehman et coll., 2000, Puigserver et coll., 1998, Wu et coll., 1999). Dans une expérience réalisé chez le rat, l'activité physique induite par stimulation électrique provoque une augmentation de l'expression protéique de PGC-1 α et de la cytochrome c oxydase (Irrcher et coll., 2003a). Cette étude a permis de mettre en évidence *in vivo* un lien entre l'activité physique, PGC-1 α et la biogenèse mitochondriale.

Il semblerait que dans les processus d'adaptations induits par l'exercice, le coactivateur transcriptionnel PGC-1 α soit au carrefour de l'ensemble des hypothèses calciques, énergétiques et radicalaires impliqués dans la régulation de la biogenèse mitochondriale (St-Pierre et coll., 2006).

3.3.4 Rôle du coactivateur transcriptionnel PGC-1 α

Des études ont montré que la demi-vie d'une mitochondrie pouvait varier de 9 jours pour le foie jusqu'à 30 jours pour le cerveau (Gross et coll., 1969, Menzies et Gold, 1971).

Le processus de biogenèse mitochondriale est un mécanisme complexe qui implique environ 3000 gènes dont une partie sont portés par l'ADNmt. L'ADNmt, code seulement 37 protéines et l'ensemble des autres protéines sont codées par le génome nucléaire. Par sa capacité à initier la biogenèse mitochondriale dans de nombreux modèles expérimentaux, PGC1- α peut être considéré comme le « chef d'orchestre » de ce processus (Lin et coll., 2005).

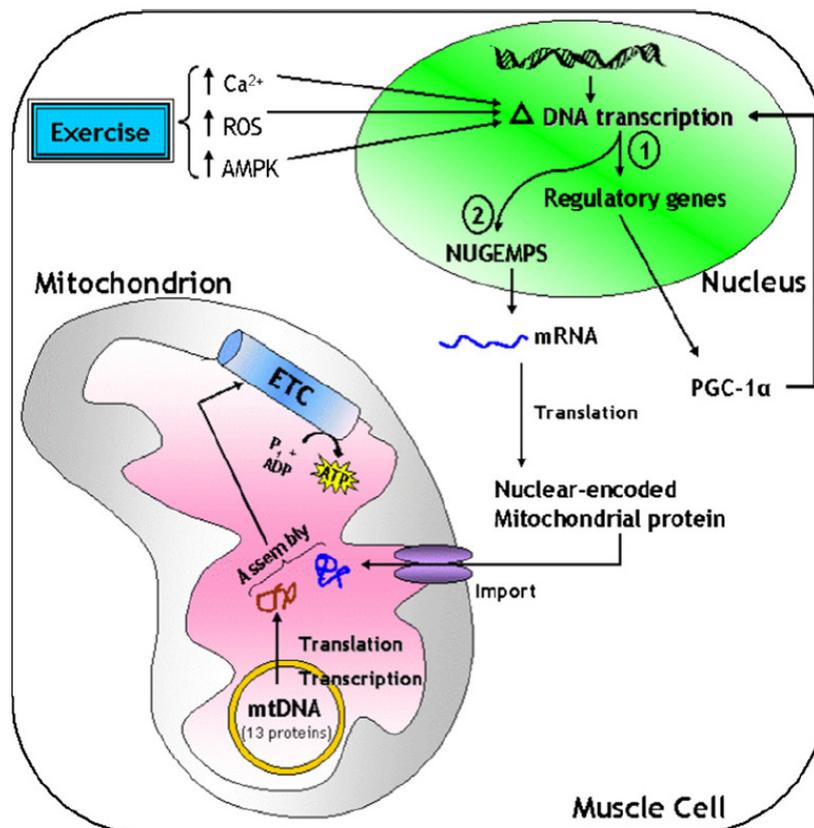


Figure 25 : Schéma d'induction de la biogenèse mitochondriale au niveau musculaire via PGC-1 α .

(Hood et Saleem, 2007)

Les principales étapes impliquées dans ce processus au cours de l'exercice peuvent être résumées sur la figure 25 : l'apparition d'événements signaux provoquée par la contraction musculaire mène à la régulation transcriptionnelle des gènes nucléaires encodant les protéines mitochondriales. Ces gènes nucléaires sont principalement induits par le coactivateur transcriptionnel PGC-1 α . Ce facteur de régulation co-transcriptionnel induit la

biogenèse mitochondriale en activant un groupe de facteurs de transcription, incluant les facteurs respiratoires nucléaires (NRF1 et NRF2), qui activent le facteur de transcription mitochondrial A (mTFA). Des études précédentes ont montré que NRF1 et NRF2 contribuent fortement à l'augmentation des transcrits des enzymes mitochondriales clés et qu'ils interagissent avec mTFA qui lui initie la réplication et la transcription de l'ADNmt (Wu et coll., 1999).

Suit alors le processus d'import des produits des gènes nucléaires dans la mitochondrie par le système membranaire d'import protéiques (TOM-TIM) et enfin l'assemblage des sous unités nucléaires et mitochondriales en complexes fonctionnels au sein de la mitochondrie (Bohnert et coll., 2007).

L'induction du facteur de transcription PGC-1 α est principalement réalisé dans les situations où les acides gras sont les substrats énergétiques privilégiés : naissance, jeûne, exercice. Dans le foie, PGC-1 α co-induit avec le facteur de transcription HNF-4 la transcription de CPT-1 (Louet et coll., 2002). L'exercice d'endurance, connu pour privilégier l'utilisation des acides gras, active PGC-1 α et conduit à une augmentation de la biogenèse mitochondriale et à un fonctionnement plus efficace du muscle (Baar, 2004, Joseph et coll., 2006). PGC1- α est impliqué aussi dans la transformation du type de fibre passant d'un profil glycolytique vers un profil oxydatif et dans l'augmentation des protéines contractiles (Sandri et coll., 2006).

Nous avons vu que l'exercice induit une augmentation des concentrations en AMP, due à une consommation accrue en ATP, suffisante pour activer l'AMPK par phosphorylation dont le mécanisme est encore méconnu (Atherton et coll., 2005). Dans le même temps, l'expression de PGC-1 α est induite par l'AMPK par un mécanisme là encore mal caractérisé. Ainsi, la voie de signalisation AMPK-PGC-1 α semble être impliquée dans les réponses adaptatives à l'entraînement en endurance menant à la biogenèse mitochondriale (Atherton et coll., 2005).

En modifiant certaines étapes menant à la biogenèse mitochondriale, l'exercice se positionne comme un modèle extrêmement utile pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la formation de cet organite.

**HYPOTHESES ET OBJECTIFS
SCIENTIFIQUES**

HYPOTHESES ET OBJECTIFS SCIENTIFIQUES

Il est donc parfaitement connu que l'activité physique est liée à une augmentation de la consommation en oxygène et de la production de radicaux libres mitochondriaux (Alessio et Goldfarb, 1988, Davies et coll., 1982, Sen, 1995). Cependant les études sur les effets de l'activité physique sur les adaptations de l'organisme au stress oxydant se sont principalement focalisées sur les variations du statut antioxydant ou des indices des dommages oxydants occasionnés par l'activité physique (Banerjee et coll., 2003, Niess et Simon, 2007). Très peu d'études ont exploré les adaptations mitochondriales fonctionnelles liés à l'activité physique aux travers d'outils permettant d'observer parallèlement les paramètres d'oxydation phosphorylante et de production de radicaux libres. Les seules études réalisées présentent quelques limites dont la qualité de la sonde utilisée et surtout les conditions de mesures (substrats respiratoires) (Molnar et coll., 2006, Servais et coll., 2003, Venditti et coll., 2007, Venditti et coll., 1999).

Une question ressort nettement de l'ensemble de ces travaux :

L'activité physique modérée induit-elle une modification de la production mitochondriale d'espèces réactives de l'oxygène ? Si oui, observe-t-on en parallèle des adaptations fonctionnelles des mitochondries.

L'objectif principal de ce travail a porté sur l'étude des effets de l'exercice modéré, aigu ou chronique, sur les mécanismes de production de radicaux libres au niveau mitochondrial. Nous avons particulièrement insisté sur l'utilisation de conditions de mesure permettant de préciser le site des adaptations le cas échéant. Nos travaux ont porté sur le muscle ainsi que sur le foie de façon à préciser si ce dernier est aussi affecté par l'exercice.

La première partie a consisté à étudier la production mitochondriale de ROS après un exercice unique ou deux heures après afin de préciser si les effets de l'exercice disparaissent avec l'arrêt de ce dernier.

La seconde partie a concerné l'étude des effets de l'entraînement en endurance sur la production de ROS et sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire.

Enfin la troisième partie a consisté à étudier les conséquences d'une diminution d'expression de PGC-1 α sur le fonctionnement mitochondrial en réponse à l'entraînement afin de préciser le degré d'implication de ce facteur de transcription sur les adaptations mitochondriales.

MATERIEL ET METHODES

1 Traitement des animaux

L'ensemble des travaux a été réalisé sur des rats mâles de souche Wistar âgés de 6 semaines en début de protocole (poids : $220\text{g} \pm 20$). Les rats étaient élevés dans l'animalerie du laboratoire où la luminosité (cycle circadien 12h jour/12h nuit) et la température ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$) sont contrôlées. Les rats ont eu accès à une alimentation standard de type entretien (SAFE A04) et à de l'eau de boisson à volonté. Pour le suivi longitudinal des paramètres de poids corporels et de prise alimentaire, les rats étaient placés en cage individuelle.

1.1 Groupes expérimentaux

Pour la réalisation des différentes études, les animaux ont été répartis en 6 groupes expérimentaux différents selon les détails portés sur le tableau (Tableau 5).

Groupes	Nombre
Contrôle	8
Exercice t^{0h}	8
Exercice t^{+2h}	8
Entraînement	10
Entraînement + PGC-1 α /AS	10
PGC-1 α /AS	10

Tableau 5 : Composition des groupes expérimentaux : rats Wistar.

Pour éviter d'éventuels biais expérimentaux, tous les animaux ont été habitués à la course sur tapis roulant pendant une semaine, à raison de 5 minutes par jour à une vitesse de déroulement du tapis de 15m/min. Les animaux contrôles ont été manipulés régulièrement pour le change et les pesées.

1.1.1 Protocole d'exercice sur tapis roulant

Les paramètres qui ont été utilisés dans ce protocole d'exercice sur tapis roulant se basent sur les travaux de Wisloff réalisés en 2001 qui décrivent un ensemble de conditions optimales pour la mise en place d'un protocole d'activité modérée concernant le temps, la vitesse de course et l'inclinaison du tapis (Wisloff et coll., 2001). Dès 4 semaines d'entraînement, ceux-ci font apparaître dans leur étude sur le rat des modifications physiologiques. Ils reportent principalement une diminution du pouls de repos et une augmentation de la masse ventriculaire. De plus, il observe que l'augmentation de VO_{2max} , importante dans les premières semaines (+40%), plafonne à partir de la 5^{ème} semaine d'entraînement. L'intensité de travail de 25m/min pendant 60 minutes avec une pente positive du tapis de 10%, qui a été retenue pour notre étude, représente chez le rat ~75% de la consommation maximale d'oxygène (Brooks et White, 1978).

1.1.1.1 Exercice unique



Figure 26 : Tapis roulant pour rongeurs

Les animaux des groupes Exercice t^{0h} et Exercice t^{+2h} ont réalisé une course unique sur tapis roulant 12 pistes pour rongeur à intensité et pente ajustable (Gymrol, Tecmachine, Andrézieux, France) (Figure 26). Les deux groupes ont réalisé une course de 60 minutes à 25m/min et 10% de pente positive. Les animaux ont été sacrifiés soit dès la fin de l'exercice (groupe Exercice t^{0h}) soit 2 heures (groupe Exercice t^{+2h}). Une stimulation électrique a été utilisée occasionnellement pour encourager l'activité des rats.

1.1.1.2 Exercice chronique

Des animaux ont été entraînés sur tapis roulant pendant 6 semaines à raison de 5 jours/semaine. La vitesse, la durée et la pente du tapis ont été augmentées progressivement durant la première semaine d'habituation pour atteindre respectivement 25m/min, 60min/jour et 10%.

Dans le but d'éviter les effets de la dernière session d'activité forcée et de mesurer uniquement les mécanismes d'adaptations chroniques, les rats sont sacrifiés un jour après le dernier exercice

1.1.2 Traitement aux oligonucléotides antisens PGC-1 α (PGC-1 α /AS)

1.1.2.1 Principe

Les oligonucléotides sont des courtes séquences de nucléotides, simple-brin, généralement longs de quelques dizaines de bases obtenus par synthèse chimique.

Les oligonucléotides « antisens » sont utilisés pour reconnaître spécifiquement et avec un degré d'affinité élevé leur cible ayant une séquence complémentaire, par interactions d'appariement de bases. Le but, lorsque la cible est un ARNm, est d'inhiber la synthèse de la protéine correspondante.

1.1.2.2 Protocole expérimental

Les oligonucléotides ont été dessinés à partir de la séquence de PGC-1 α de *Rattus norvegicus* (N° d'accension : BC_066868) et *Mus musculus* (N° d'accension : NM_031347) disponible sur la base de données NIHNCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>). La séquence antisens (PGC-1 α /AS) utilisée dans nos expérimentations était la suivante : (5'-GCC ATC CAG CTC CTG A -3'), choisie à partir d'une étude précédente (Oliveira et coll., 2004)

Les oligonucléotides antisens ont été obtenus auprès de la société Eurogentec (Seraing, Belgium). Lors de la synthèse, les oligonucléotides ont été phosphorotioatés dans le but de faciliter leurs fixations aux protéines de transports tels que l'albumine, de limiter leurs dégradations par les nucléases et de faciliter ainsi leurs pénétration au niveau cellulaire.

Les oligonucléotides antisens ont été dilués à une concentration finale de 20 μ M dans un tampon contenant 10 mM de Tris-HCl et 1mM d'EDTA. Les rats des groupes Entraînement + PGC-1 α /AS et PGC-1 α /AS ont reçu une injection quotidienne pendant 6 semaines par voie intrapéritonéale d'une dose de 200 μ l de solution antisens (PGC-1 α /AS).

Selon certains auteurs, l'utilisation de tels nucléotides antisens provoque une réduction d'expression de PGC-1 α d'environ 60% dans les îlots pancréatiques et de 70% dans le muscle squelettique (De Souza et coll., 2003, Oliveira et coll., 2004).

2 Préparation du matériel biologique

2.1 Prélèvement tissulaire

L'anesthésie aux barbituriques modifiant les propriétés membranaires des mitochondries, tous les rats ont été sacrifiés par décapitation à la guillotine.

Après décapitation du rat, la cavité abdominale a été rapidement ouverte puis le foie a été extrait pour en isoler les mitochondries. Une portion du grand lobe hépatique a été découpée, clampée et immergée dans de l'azote liquide puis conservée à -80°C . Les muscles quadriceps des deux pattes postérieures ont ensuite été prélevés. Les parties rouges profondes ont été isolées pour la préparation des mitochondries. Une portion a été prélevée puis clampée et immergée dans l'azote liquide, pour analyses ultérieurs. Les muscles soléaires et gastrocnémien rouges ont été rapidement excisés et congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C .

2.2 Préparation des mitochondries isolées

2.2.1 Principe

La procédure d'isolement des mitochondries repose sur la technique de fractionnement par centrifugation différentielle des composés cellulaires décrite par (Hogeboom et Schneider, 1956).

2.2.2 Protocole expérimental

2.2.2.1 Isolement des mitochondries de foie

Pour limiter l'activité enzymatique des protéases, toute la procédure d'isolement se déroule rapidement en chambre froide à 4°C . Après le sacrifice du rat, le foie a été immédiatement refroidi par immersion dans un tampon d'homogénéisation à 4°C (250 mM Saccharose, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, pH 7,4) et émincé aux ciseaux. Les morceaux obtenus ont été rincés avec du tampon pour éliminer un maximum d'hématies et de « gras » extracellulaire. Ils ont été ensuite homogénéisés par 5 allers-retours de piston en téflon dans un Potter Eljevhem motorisé, tournant à 500 tours/min. L'homogénat a été ensuite centrifugé

10 minutes à 800g à 4°C pour sédimenter les débris cellulaires et les noyaux. Le surnageant contenant les mitochondries a été transféré dans un autre tube et centrifugé à 8000g, à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant a été alors éliminé et le culot mitochondrial doucement re-suspendu dans le tampon d'homogénéisation pour rincer les mitochondries. Une dernière centrifugation de rinçage à 8000g pendant 10 minutes à 4°C a été ensuite effectuée. Le culot de mitochondries obtenu a été remis en suspension dans 500µl de tampon d'homogénéisation (volume permettant d'obtenir des concentrations protéiques mitochondriales avoisinant les 60 mg/ml).

2.2.2.2 *Isolement des mitochondries de muscle*

Toute la procédure d'isolement se déroule en chambre froide à 4°C. La partie profonde des deux muscles quadriceps a été prélevée et découpée aux ciseaux en petits morceaux dans un tampon d'homogénéisation (150 mM Saccharose, 75 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM KH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0,2% BSA, pH 7,4). Les morceaux ont été rincés avec du tampon d'homogénéisation pour éliminer un maximum d'hématies. Ensuite, 0.2 mg.ml⁻¹ de protéase ont été ajoutés à la suspension dans un volume final de 30ml. Après une minute d'activité de la protéase, le tissu a été homogénéisé par 10 allers-retours de piston dans un Potter Eljehelm motorisé, tournant à 500 tours/min. L'homogénat a été centrifugé 10 minutes à 4°C à 800g pour sédimenter les débris cellulaires. Le surnageant contenant les mitochondries a été filtré sur gaze et collecté dans un autre tube puis centrifugé à 8000g à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant a été éliminé et le culot mitochondrial doucement re-suspendu dans le tampon d'homogénéisation pour rincer les mitochondries. Une dernière centrifugation de rinçage à 8000g pendant 10 minutes à 4°C a été ensuite effectuée. Le culot de mitochondries obtenu a été remis en suspension dans 300 µl de tampon d'homogénéisation (volume permettant d'obtenir des concentrations protéiques mitochondriales avoisinant les 20 mg/ml).

2.3 Détermination des concentrations protéiques

2.3.1 Principe

Les concentrations protéiques ont été mesurées à l'aide de la méthode « BCA Protein Assay » de Pierce[®] (Pierce, Rockford, IL) qui se base sur la réduction du Cu²⁺ en Cu⁺ par les

liaisons peptidiques des protéines lorsqu'elles sont dans un milieu alcalin. L'acide bicinchoninique chélate les ions Cu^+ avec une très forte spécificité et forme un complexe soluble coloré en violet permettant une détection par colorimétrie. L'absorbance est directement proportionnelle à la concentration protéique qui est calculée à l'aide d'une courbe référence obtenue avec de l'albumine sérique (BSA).

2.3.2 Protocole expérimental

Les échantillons à doser ont été dilués (au $1/50^{\text{ème}}$ pour les mitochondries de muscle et au $1/100^{\text{ème}}$ pour les mitochondries de foie). Trois aliquotes de 25 μl ont été déposés sur une microplaque de 96 puits auxquels ont été ajoutés 200 μl du réactif de Pierce[®] préparé selon les recommandations du fabricant. Après une incubation de 30 minutes à 37°C, la lecture a été effectuée sur un lecteur de plaque (ELX800 BioTek Instruments) à 562 nm. Les résultats ont alors été traités par le logiciel KC Junior et exprimés en mg/ml.

3 Techniques d'études et de mesures utilisées sur mitochondries isolées.

3.1 Oxygraphie

3.1.1 Principe

La consommation d'oxygène est mesurée dans un oxygraphe (Hansatech Instrument), consistant en une chambre fermée, thermostatée et agitée, munie d'une électrode de Clark (Clark, 1956). L'électrode de Clark est composée d'une cathode en platine polarisée à -0,7 Volts et d'une anode en argent au contact d'une solution de KCl à demi-saturée. Elle est séparée du milieu à mesurer par une membrane en téflon perméable à l'oxygène. L'oxygène est réduit au niveau de la cathode, créant une différence de potentiel proportionnelle à la quantité d'oxygène présente dans le milieu (figure 27). Il est donc possible de mesurer directement la vitesse de respiration mitochondriale dans différentes conditions expérimentales.

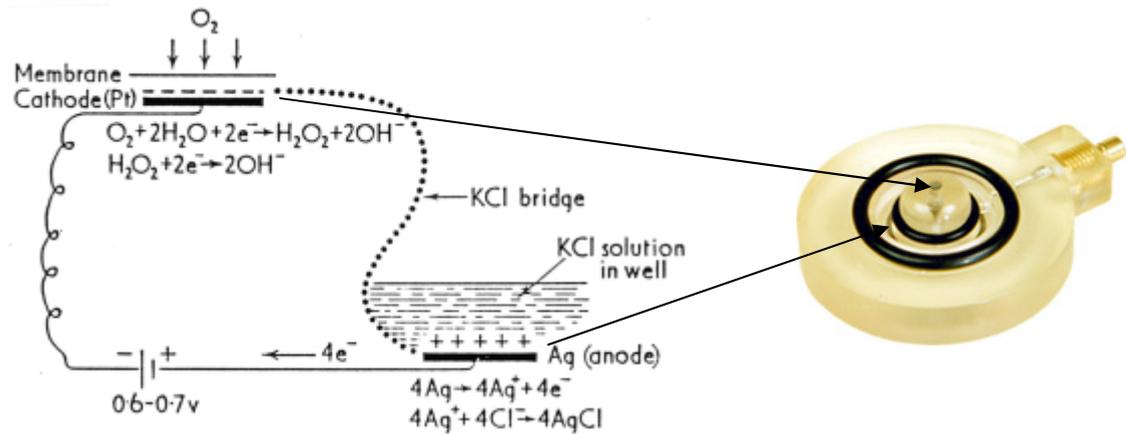


Figure 27 : Schéma de principe de l'électrode de Clark (Hansatech Electrode S1).

3.1.2 Protocole expérimental

La consommation d'oxygène mitochondriale est mesurée dans une chambre d'oxygraphie (figure 28) (Hansatech Instruments) fermée, agitée et thermostatée à 30°C. Les signaux produits par les électrodes ont été recueillis à l'aide d'un ordinateur équipé d'une carte d'acquisition et traités à l'aide du logiciel Oxygraph+ (Hansatech Instruments) puis exprimés en nmol d'O₂/ml.

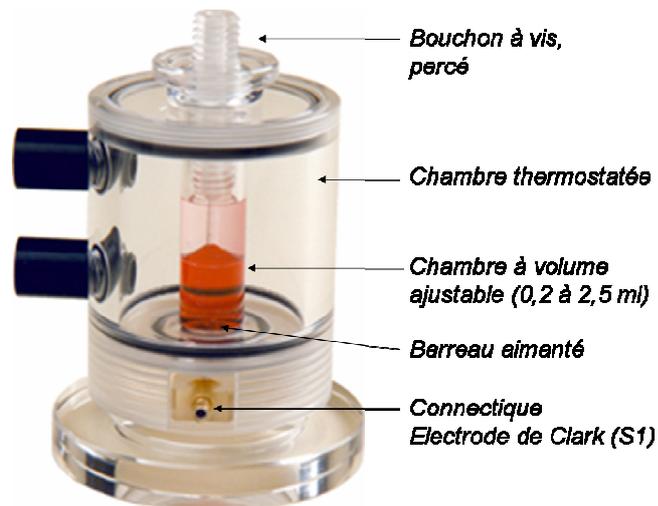


Figure 28 : Chambre d'oxygraphie ajustable. Hansatech Instruments.

Les mesures de consommation d'oxygène sur mitochondries isolées ont été réalisées par simple adjonction des organites (0,2 mg/ml de mitochondries musculaires ou 0,5 mg/ml de mitochondries hépatiques) dans un volume final de 1,5 ml de tampon ionique de respiration (125 mM KCl, 20 mM Tris Base, 1 mM EGTA, 0,15% de BSA-FFA, 5 mM Pi-Tris, pH 7,2). Différents substrats respiratoires, permettant d'isoler fonctionnellement les

différents sites de couplage de la chaîne respiratoire, ont été utilisés en concentrations saturantes (Figure 29).

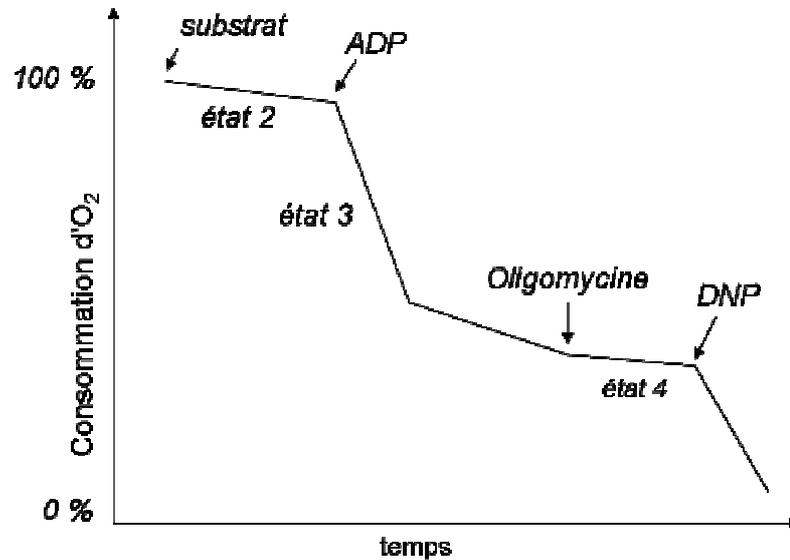


Figure 29 : Représentation schématique des différents états respiratoires en fonction de l'addition des substrats ou inhibiteurs.

Les différentes combinaisons de substrats utilisées sont les suivantes :

- soit une association de glutamate/malate (5,5 mM/2,5 mM), afin d'explorer la chaîne respiratoire à partir du complexe de la NADH-ubiquinone déshydrogénase (complexe I), le malate fixe la concentration de l'oxaloacétate en évitant l'accumulation de l' α -cétoglutarate, métabolite du glutamate qui inhibe la respiration cellulaire en inhibant la succinate déshydrogénase.
- soit du succinate (5 mM), afin d'explorer la chaîne respiratoire à partir du complexe de la succinate déshydrogénase (complexe II).
- soit une association glutamate/malate (5 mM/2,5 mM) + succinate (5 mM), permettant d'activer l'ensemble de la chaîne respiratoire
- soit du palmitoyl-L-carnitine (55 μ M), un acide gras à chaîne longue, afin d'explorer son action sur la respiration mitochondriale.

La mesure de la consommation d'oxygène dans ces conditions donne la respiration à l'état 2.

L'adjonction de 300 μ M d'ADP permet d'obtenir la respiration à l'état 3, c'est à dire en conditions phosphorylantes (figure 29)

La respiration oligomycine-insensible, représentative du "leak" qui est obtenue après adjonction de 1,25 μ g/ml d'oligomycine, inhibiteur de l'ATP synthase empêche la réentrée des protons dans la matrice. Cette respiration résiduelle à l'état 4, est donc la seule conséquence d'une réentrée passive de protons au travers de la membrane

L'adjonction de découplant protonophore (DNP, 75 μ M) permet d'obtenir une respiration découplée à la synthèse d'ATP (Figure 29).

Les concentrations et volumes en substrats et en inhibiteurs utilisés sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Substrats / Inhibiteurs	Solutions mères	Molarité finale	Volume ajouté (qsp 1,5ml)
Glutamate/Malate	0,5M/0,25M	5 mM / 2,5 mM	15 μ l
Succinate/Roténone	1M / 2 mM	5 mM / 2,5 μ M	8 + 2 μ l
Glutamate/Malate/Succinate	0,5M/0,25M/1M	5 mM/2,5 mM/5 mM	15+ 8 μ l
Palmitoyl-Carnitine/Malate	10mM/0,25M	50 μ M / 1 mM	8 + 5 μ l
ADP	100mM	300 μ M	4,5 μ l
Oligomycine	0,5mg/ml	1,25 μ g/ml	1,5 μ l
DNP	50mM	75 μ M	2,5 μ l

Tableau 6 : Concentrations des substrats et inhibiteurs utilisés sur mitochondries isolées en oxygraphie.

3.2 Fluorimétrie : Mesure de la production de ROS

3.2.1 Principes

3.2.1.1 Principe de fluorescence

La production d'H₂O₂ est mesurée par spectrofluorimétrie. La fluorescence repose sur l'interaction entre un rayonnement et la matière. Un rayonnement lumineux excite des électrons d'une molécule qui passe alors de son état d'énergie de départ E₀ à un état d'énergie supérieur E₁ (Figure 30).

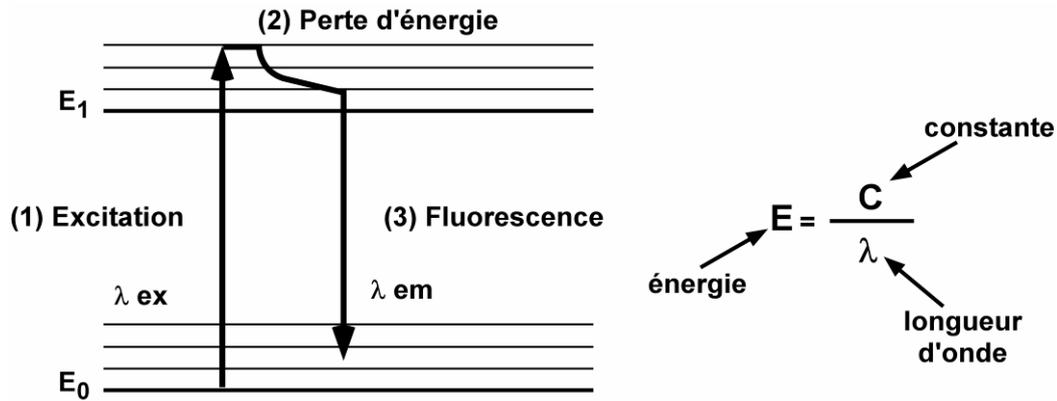


Figure 30: Représentation schématique du principe de fluorescence.

On parle alors d'absorption d'énergie. La molécule excitée revient ensuite vers son état énergétique stable en émettant l'énergie absorbée. Cette perte d'énergie est appelée fluorescence. Ces phénomènes sont très rapides (10^{-13} secondes pour l'absorption et 10^{-8} secondes pour la fluorescence). L'énergie est inversement proportionnelle à la longueur d'onde. Ceci implique que la longueur d'onde d'émission est toujours supérieure à la longueur d'onde d'excitation.

Cependant, toutes les molécules ne sont pas capables d'absorber de l'énergie et d'émettre de la fluorescence. Il faut qu'une partie de la molécule, appelée chromophore, soit capable de subir une transition électronique à des longueurs d'ondes utilisables. De façon générale, les liaisons multiples sont de bons chromophores. Ainsi pour effectuer des expériences de fluorescence, deux possibilités se présentent : soit la molécule étudiée possède un chromophore intrinsèque, c'est le cas par exemple du NADH, soit on utilise un chromophore extrinsèque ou sonde artificielle.

3.2.1.2 Principe de mesure avec la sonde artificielle : Amplex Red

La mesure de production de ROS de la chaîne respiratoire mitochondriale est estimée par la mesure de production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En présence de peroxydase du raifort (horseradish peroxidase, HRP) l'Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) est oxydé par l' H_2O_2 en un composé dimérique fluorescent : la Resorufin ($\lambda_{excitation} = 560$ nm et $\lambda_{émission} = 584$ nm) dans un rapport stœchiométrique de 1:1.

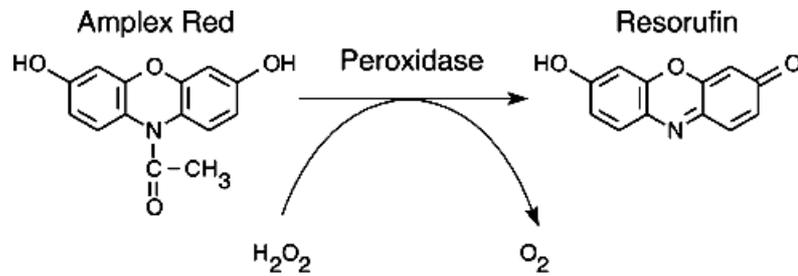


Figure 31 : Equation d'oxydation de l'Amplex Red par l'H₂O₂.

La Resorufin est excitée par un faisceau monochromatique d'une longueur d'onde de 560 nm. Son retour à l'état non excité génère un photon détectable dans la longueur d'onde d'émission spécifique du composé : 584nm. La fluorescence mesurée est directement proportionnelle à la production d'H₂O₂. Il est donc possible de mesurer directement la vitesse de production mitochondriale d'H₂O₂ en fonction de différentes conditions.

3.2.2 Protocole expérimental

Les mesures ont été effectuées avec un spectrofluorimètre thermostaté à 30°C (Hitachi) couplé à un ordinateur permettant le recueil et l'analyse des données en cinétique. Les mesures ont été réalisées dans une cuve en quartz contenant 1,9 ml de milieu réactionnel (125 mM KCl, 20 mM Tris Base, 1 mM EGTA, 0,15% de BSA délipidée, 5 mM Pi-Tris, pH 7,2) auquel ont été ajoutés extemporanément 1µM Amplex Red et 6U/ml HRP.

Les mitochondries sont ensuite ajoutées (0,2 mg/ml de mitochondries musculaires ou 0,25 mg/ml de mitochondries hépatiques) dans la cuve.

La mesure est lancée pour une succession d'états stables de 5min (Figure 32). Après une période de stabilisation correspondant à la production basale de ROS, un des 4 substrats respiratoires d'intérêt a été ajouté dans la cuve : le mélange glutamate/malate (5 mM / 2,5 mM), le succinate (5 mM), le mélange glutamate/malate/succinate (5 mM / 2,5 mM / 5 mM) ou le Palmitoyl-L-carnitine (50µM) permettant de mesurer la production de ROS à l'état 2. Pour chaque substrat, 300µM d'ADP (Etude « Exercice unique » seulement) ont été ajoutées pour mesurer la production d'H₂O₂ à l'état 3. Pour mesurer la production de ROS pendant 5 minutes avec le complexe I inhibé, 1,5 µM de roténone ont été ajoutées. Enfin 1,5 µM d'Antimycine A ont été ajoutées pour inhiber le complexe III. La production de ROS a été exprimée en pmol d'H₂O₂/mg protéines à partir de la variation de fluorescence engendrée par l'ajout au milieu réactionnel, contenant les mitochondries, d'une quantité connue d'H₂O₂ équivalente à 450 pmol (évaluée par spectrométrie ($\lambda_{\text{absorption}} \text{H}_2\text{O}_2 = 240 \text{ nm}$)) obtenue par

dilution d'une solution mère à 30%. De plus, cette variation de fluorescence qui dépend de l'action des mécanismes de défenses antioxydantes endogènes a été utilisée comme indicateur du statut antioxydant total mitochondrial.

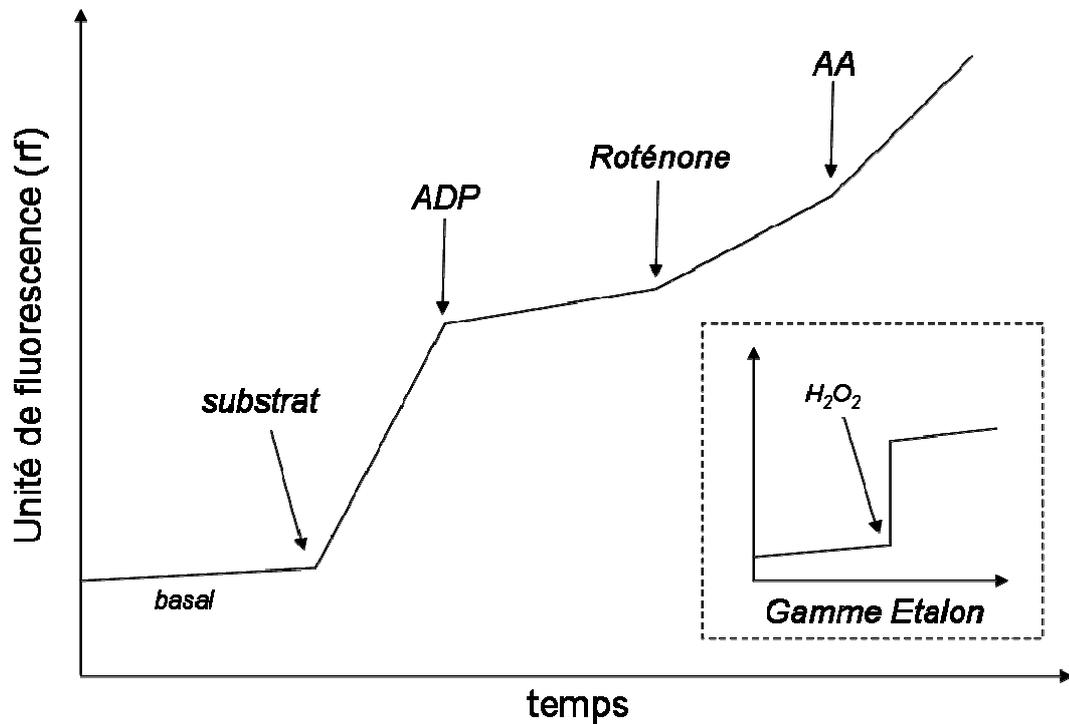


Figure 32 : Représentation schématique de la mesure de production de ROS par fluorimétrie en fonction de l'addition des substrats ou inhibiteurs.

Les concentrations et volumes en sonde, substrats et inhibiteurs utilisés sont résumés dans le tableau 7 ci-dessous.

Substrats / Inhibiteurs	Solutions mères	Molarité finale	Volume ajouté (qsp 2ml)
Amplex Red	1mM	1 μ M	2 μ l
HRP	6000U/ml	6U/ml	2 μ l
Glutamate/Malate	0,5M/0,25M	5 mM / 2,5 mM	20 μ l
Succinate	1M	5 mM	10 μ l
Glutamate/Malate/Succinate	0,5M/0,25M/1M	5 mM/2,5 mM /5mM	20 + 10 μ l
Palmitoyl-Carnitine/Malate	10mM/0,25M	50 μ M / 1 mM	10 + 8 μ l
ADP	100mM	300 μ M	6 μ l
Roténone	2mM	1,5 μ M	1,5 μ l
Antimycine A	1mM	1,5 μ M	3 μ l

Tableau 7 : Concentrations des substrats et inhibiteurs utilisés sur mitochondries isolées en fluorimétrie pour la mesure de la production de ROS.

3.3 Mesure des activités enzymatiques

3.3.1 Mesures d'activité des complexes de la chaîne respiratoire

3.3.1.1 Principe

Le principe des dosages repose sur le transfert d'électrons d'un donneur à un accepteur. Les dosages permettent la mesure par spectrophotométrie du taux d'apparition de l'accepteur réduit ou du taux de disparition du donneur oxydé.

Les activités s'expriment en nanomoles de substrats transformés ou de produits apparus par minute et par mg de protéines mitochondriales à partir de la variation de densité optique (ΔDO) du substrat ou produit suivi.

$$\Delta DO = \epsilon \cdot l \cdot C$$

ϵ : coefficient d'extinction molaire exprimé en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, l : longueur du trajet optique en cm et C : concentration des espèces absorbantes en mM^{-1} .

3.3.1.2 Protocole expérimental

Les mesures d'activités enzymatiques des différents complexes de la chaîne respiratoire ont été réalisées par spectrophotométrie dans des cuves agitées et thermostatées à 37°C . L'ensemble des suspensions mitochondriales ont subi, avant les mesures, trois cycles de congélation (azote liquide) décongélation ($T^\circ\text{C}$ ambiante) pour faciliter l'accès des substrats aux enzymes.

- Mesure d'activité du complexe I

Cette mesure détermine l'activité NADH-ubiquinone oxidoreductase roténone-sensible.

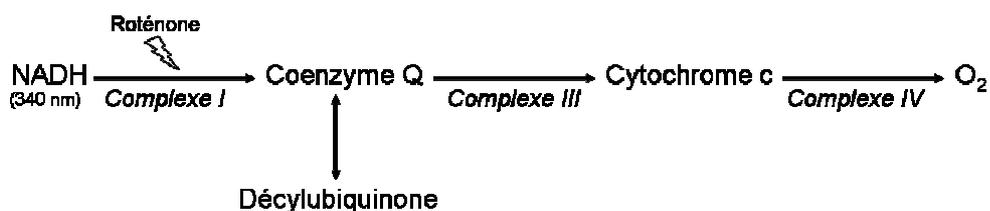


Figure 33 : Principe réactionnel du dosage d'activité du complexe I.

L'équivalent de 10 μ g de mitochondries hépatiques ou 5 μ g de mitochondries musculaires ont été placés dans une cuve contenant du tampon KPi (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,5) auquel sont ajoutés 3,75 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de BSA délipidée, 100 μ M de décylubiquinone (accepteur d'électrons), et 100 μ M de NADH (donneur d'électrons) réalisés extemporanément. L'oxydation du NADH a été suivie par la mesure de la décroissance de la DO à 340 nm pendant 2 minutes. L'addition de 10 μ M de roténone pendant 2 minutes permet de soustraire à l'activité spécifique, la dérive liée à une oxydation du NADH non spécifique au complexe I. Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) d'une mole de NADH est de 6,22 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

La mesure de l'activité de ce complexe fait apparaître deux pentes distinctes. La première pente a été retenue dans nos expérimentations. Les résultats ont été exprimés en nmol/min/mg protéines.

- Mesure de l'activité du complexe II

Cette mesure déterminant l'activité dépendante de la succinate deshydrogénase a été faite en suivant la réduction de 2,6-dichloroindophénol (DCIP) par les électrons transférés du succinate vers la decylubiquinone.

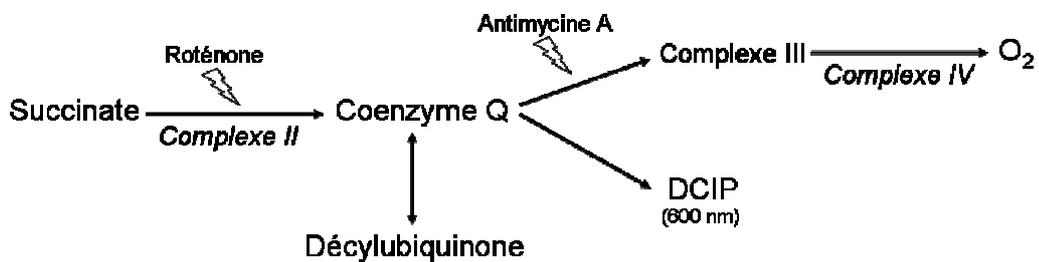


Figure 34 : Principe réactionnel du dosage d'activité du complexe II.

L'équivalent de 20 μ g de mitochondries hépatiques ou 5 μ g de mitochondries musculaires ont été incubés dans une cuve contenant du tampon KPi (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,5) auquel sont ajoutés 3,75 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de BSA délipidée, 30 mM de Succinate, 50 μ M de décylubiquinone, 9,3 μ M d'Antimycine A, 5 μ M de roténone et 100 μ M de dichloro-indophénol (DCIP) préparées extemporanément. La réduction du DCIP a été suivie par la mesure de la décroissance de la DO à 600 nm pendant 3 minutes à 37 °C. Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) d'une mole de DCIP est de 19,1 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Les résultats ont été exprimés en nmol/min/mg protéines.

- Mesure de l'activité du complexe IV

Cette mesure est basée sur la détermination de la vitesse d'oxydation de cytochrome c réduit à 95% par la cytochrome oxydase.



Figure 35 : Principe réactionnel du dosage d'activité du complexe IV.

La première étape expérimentale de ce dosage du complexe IV a consisté en la réduction à 95% du cytochrome c. Un volume de cytochrome c oxydé (1mM) a été préparé. Une portion de ce volume a été totalement réduite par l'ajout d'un excès de dithionite de sodium et un spectre (530-570 nm) a été réalisé. La valeur de DO à 550 nm, au pic d'absorption du cytochrome c réduit à 100%, a été utilisé comme référence. L'aliquote de cytochrome c réduit à 100% a été utilisé pour réduire progressivement le cytochrome c oxydé. L'état de réduction a été suivi par mesure de spectre et comparé à la référence. Une solution de cytochrome c trop réduite, peut être réoxydée par l'ajout de cytochrome c oxydé ou de ferricyanure de potassium.

Pour les mesures sur échantillons, l'équivalent de 10µg de mitochondries hépatiques ou 2µg de mitochondries musculaires ont été placés dans un milieu KPi (50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7) contenant 80 µM de cytochrome c préalablement réduit à 95 %. L'oxydation du cytochrome c a été suivie par la mesure de la décroissance de la DO à 550 nm à 37 °C pendant 5 minutes. Le coefficient d'extinction molaire (ε) d'une mole de cytochrome c est de 29,5 mM⁻¹.cm⁻¹. Les résultats ont été exprimés en nmol/min/mg protéines.

3.3.2 Mesure de la cytochrome oxydase par oxygraphie

3.3.2.1 Principe

L'activité de la cytochrome oxydase peut être obtenue en mesurant la consommation d'oxygène de mitochondries isolées en présence de N,N,N',N'-tétraméthyl-p-phénylenediamine (TMPD) et d'ascorbate. L'association TMPD-ascorbate constitue un couple donneur-accepteur d'électrons pour le complexe IV. Le TMPD réduit le cytochrome c,

substrat pour la cytochrome oxydase et l'ascorbate est utilisé pour régénérer la forme réduite du TMPD qui peut à nouveau réduire le cytochrome c.

3.3.2.2 *Protocole expérimental*

La mesure a été réalisée dans la chambre d'oxygraphie avec le milieu réactionnel de respiration (décrit en partie 3.1.2) dans lequel ont été incubées les mitochondries isolées. Le mélange est supplémenté avec 1,5 μM d'Antimycine A puis 2 mM d'ascorbate et 100 μM de TMPD. Les mitochondries ont été ensuite découplées par addition de 50 μM de DNP (2,4-dinitrophénol). L'Antimycine A inhibiteur du complexe III, permet d'assurer un flux électronique uniquement en direction de la cytochrome oxydase (complexe IV), empêchant un éventuel flux électronique inverse en direction du complexe I. Les résultats ont été exprimés en nmol d'O/min/mg de protéine mitochondriale.

3.3.3 Dosage de la citrate synthase

3.3.3.1 *Principe*

La citrate synthase est une enzyme du cycle de l'acide citrique spécifique de la matrice mitochondriale. Son activité exprimée par quantité de tissu est un index de la densité mitochondriale ou plus précisément de la quantité de cycle de Krebs. L'activité de la citrate synthase a été mesurée selon la technique colorimétrique de Srere (1969) basée sur la mesure de l'apparition du coenzyme A qui porte un groupement sulfhydryle SH. Ce groupement réagit avec l'acide dinitrothiobenzoïque (DTNB) apporté dans le milieu réactionnel. La réaction est suivie par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 412 nm.

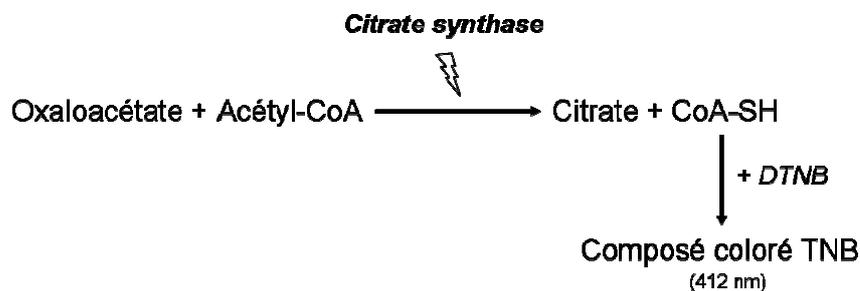


Figure 36 : Principe réactionnel du dosage d'activité de la citrate synthase.

3.3.3.2 Protocole expérimental

Les échantillons ont été soumis à 3 cycles de congélation/décongélation afin de rompre les membranes mitochondriales et de rendre l'enzyme à doser accessible à son substrat.

Une quantité de mitochondries équivalente à 0,5mg pour le foie ou 0,1mg pour le muscle ou l'équivalent de 0,2mg d'homogénat ont été incubés dans un milieu réactionnel composé de 100 μ M DTNB, 15 μ M acétylcoenzyme A, 0,9%, Triton X-100 100 mM Tris, pH 8. L'activité non spécifique a été alors déterminée par mesure de la densité optique à 412 nm pendant 4 min. La réaction débute par l'addition de 0,5 mM d'oxaloacétate et est suivie pendant 4 min. L'activité spécifique de la citrate synthase a été calculée à l'aide du coefficient d'extinction molaire (ϵ) égal à $13600\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ après soustraction de l'activité non spécifique (Srere, 1969). Les résultats ont été exprimés en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéines ou en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tissu selon les cas.

3.4 Expressions protéiques

Le niveau d'expression protéique de protéines d'intérêt a été déterminé par Western-Blot. Cette méthode de protéomique utilise l'association de technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide et de transfert sur une membrane d'hybridation. Cette appellation est un jeu de mot donné par W. Neal Burnette (*Analytical Biochemistry*, 1981) en référence à la technique initial de détection d'ADN nommée d'après son inventeur, Edwin Southern (Southern-Blot) et non d'après le point cardinal.

3.4.1 Préparation des échantillons

Les homogénats de muscle ou de foie à 5% (20mg/ml) ont été réalisés à 4°C dans un tampon de lyse composé de (20mM HEPES, 2mM EGTA, 50mM β -glycerophosphate, 3mM Benzamidine, 10% Glycérol, 1% Triton X-100 et extemporanément 1mM DTT, 1mM Na_3VO_4 , 1% Protease Inhibitor Cocktail *Sigma* P-8340) à l'aide d'un broyeur de tissu à bille (Hoescht MM300). La concentration protéique des échantillons a été déterminée par la méthode de Pierce[®] (voir 2.3). Les homogénats ont été conservés comme les mitochondries à -80°C pour utilisation ultérieure.

Le jour même de l'expérimentation, les échantillons sont décongelés, dilués selon la quantité protéique souhaitée et incubés 5 minutes à 95°C dans une solution de dénaturation (tampon de Laemmli), contenant 62,5 mM Tris HCl, 0,0025 %, bleu de bromophénol, 2 % SDS, 10 % glycérol, pH 6,8 et additionnés extemporanément de 20% de beta-mercaptoéthanol.

La dénaturation des protéines brise les liaisons faibles intramoléculaires, ce qui a pour conséquence de les dérouler complètement. Le beta-mercaptoéthanol empêche la reformation de ponts disulfures impliqués dans le maintien de la conformation tridimensionnelle des protéines. Le glycérol augmente la densité de l'échantillon par rapport au tampon. Cela facilite le dépôt des échantillons qui stagnent ainsi plus facilement au fond des puits du gel d'électrophorèse. Le bleu de bromophénol, colorant ionisé permet de faciliter le suivi du front d'électrophorèse.

3.4.2 Electrophorèse sur gel SDS-PAGE

3.4.2.1 Principe

Le gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) utilise un polymère (mélange acrylamide/Bis-acrylamide) qui permet la séparation des protéines dénaturées en fonction de leur poids moléculaire. Le SDS leur procure un environnement riche en charges négatives, ce qui rend négligeable la charge propre de la protéine, ainsi sous l'action d'un champ électrique, seul le poids moléculaire détermine la séparation des protéines sur le gel d'acrylamide. Les protéines présentent une migration électrophorétique inversement proportionnelle au logarithme de leur masse moléculaire.

La polymérisation de l'acrylamide est catalysée par l'addition de persulfate d'ammonium (APS) et de TEMED (NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine). La polymérisation continue jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de monomère d'acrylamide libre. Cette polymérisation incorpore des molécules de bis acrylamide permettant de lier deux polymères d'acrylamide entre eux.

Le système utilisé pour le western blot comprend une isotachophorèse (gel de concentration ou stacking gel), puis une électrophorèse de zone monophasique (gel de séparation ou resolving gel). Le passage de l'une à l'autre se fait avec un changement de pH et par une augmentation de concentration en acrylamide du gel.

Après montage du gel, dans une cuve d'électrophorèse contenant différents électrolytes, l'application d'un courant électrique permet la migration des protéines au travers du gel. Sous l'action du courant électrique, les petites protéines vont vite car elles passent facilement dans les pores du gel, mais les grosses protéines sont retardées par friction avec le polymère. Le bleu de bromophénol, contenu dans le tampon de l'échantillon, n'est absolument pas retardé et indique le front de migration électrophorétique. Quand le colorant atteint le bas du gel, l'électrophorèse est généralement arrêtée.

3.4.2.2 Protocole expérimental

Le gel de concentration ou de dépôt (stacking : 4%) et le gel de migration (resolving : 10 ou 15 %) sont préparés (Tableau 8) en additionnant le TEMED et l'APS au dernier moment.

Le choix du pourcentage d'acrylamide se fait en fonction de la résolution nécessaire. Un gel à 10 % permet d'obtenir une résolution optimale pour des protéines de 30 à 80 kDa et le gel à 15% pour des protéines de 10 à 60 kDa.

Solutions	4 %	10 %	15 %
Acrylamide/Bis 40 % (ml)	0,5	3	4,5
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 (ml)	-	3	3
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (ml)	1,25	-	-
H ₂ O (ml)	3,15	5,82	4,32
SDS 10 % (ml)	0,05	0,12	0,12
APS 10 % (ml)	0,05	0,06	0,06
TEMED (µl)	6	6	6

Tableau 8: Solutions et volumes utilisés pour préparer les gels de poly-acrylamide

Les électrophorèses ont été réalisées avec le système BioRad Miniprotean III (Figure 37).

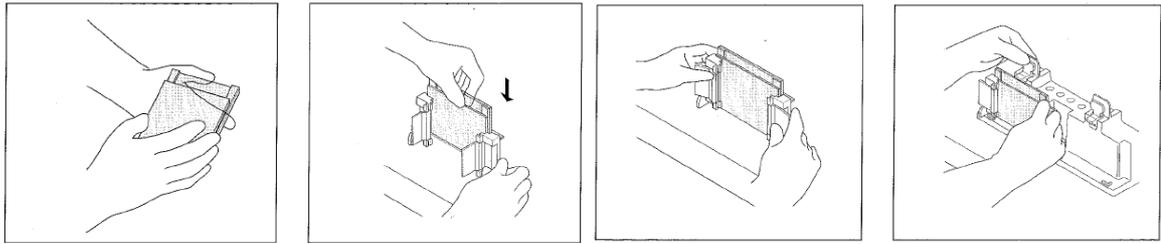


Figure 37 : Schéma explicatif du montage du support de plaque pour gel d'électrophorèse

(Mode d'emploi BioRad)

Le gel de migration a été préparé selon le tableau, puis coulé délicatement. L'équivalent d'1 ml H₂O pure a été ajouté pour supprimer toutes bulles éventuellement créée et assurer une surface plane après polymérisation. Après polymérisation (~45min.), l'eau a été complètement supprimée par retournement et aspiration.

Le gel de dépôt à 4%, préparé pendant la polymérisation précédente, a été alors coulé jusqu'en bordure de plaque et un peigne a été inséré sur le haut des plaques en évitant la formation de bulles. Après polymérisation des gels (~15min.), le peigne formant les puits a été retiré. Les puits de dépôt ont été abondamment rincés et le sandwich renfermant le gel a été placé dans une cuve d'électrophorèse contenant le tampon de migration (25 mM Tris-HCl ultra pure, 192 mM Glycine, 0.1 % SDS, pH 8,3).

Les échantillons ainsi qu'un marqueur de poids moléculaires ont alors été chargés délicatement dans les puits.

Le générateur relié à la cuve a été réglé à un voltage fixe de 150V pour une durée d'électrophorèse d'1 heure pour les gels à 10% et de 2h15 pour les gels à 15%.

3.4.3 Transfert sur membrane PVDF

3.4.3.1 Principe

Le principe du transfert est le même que celui de l'électrophorèse. Les protéines, après séparation, sont toujours entourées de SDS et donc sous l'influence d'un champ électrique, les protéines vont migrer de l'anode vers la cathode. A la petite différence qu'ici, les électrodes sont de part et d'autre du gel et non pas dans le plan du gel. L'ajout de méthanol dans la solution de transfert "active" le gel en enlevant le SDS des protéines et en augmentant la liaison des protéines à la membrane. Il a pour défaut de pouvoir diminuer le transfert de certaines protéines.

La membrane est placée face-à-face avec le gel, et un courant électrique est appliqué aux grandes plaques sur l'un des deux côtés. Les protéines chargées migrent depuis le gel vers la membrane en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel. Les membranes de nitrocellulose ou de PVDF lient des protéines de manière non spécifique. La fixation des protéines à la membrane se fait grâce à des interactions hydrophobes et ioniques entre la membrane et les protéines.

On peut, juste après le transfert, colorer la membrane avec un colorant spécifique des protéines, comme par exemple le rouge de Ponceau. Cette opération permet de visualiser si l'électrophorèse et le transfert se sont bien effectués.

3.4.3.2 Protocole expérimental

Une fois l'électrophorèse terminée et le support contenant le gel retiré. La plaque contenant le gel a été déclipée de son support et à l'aide d'un « coin » passée sous la plaque fine à l'opposé des puits, le gel a été rendu accessible. Les puits et les bords du gel ont été coupés avec le « coin ». Un papier buvard (Wattman) a été humidifié dans le tampon de transfert (25 mM Tris-HCl ultra pure, 192 mM Glycine, 0,05 % SDS, 20% Méthanol, pH 8,3) et déposé sur le gel (éviter la formation de bulles). La plaque a été alors retournée sur la main de façon à avoir le buvard dessous et le gel au dessus. La membrane nitrocellulose ou PVDF marquée a été déposée sur le gel en évitant la formation de bulles puis recouverte d'un nouveau papier buvard humidifié.

Un « sandwich » (figure 38) a été constitué entre deux éponges et placé dans un support de transfert perforé.

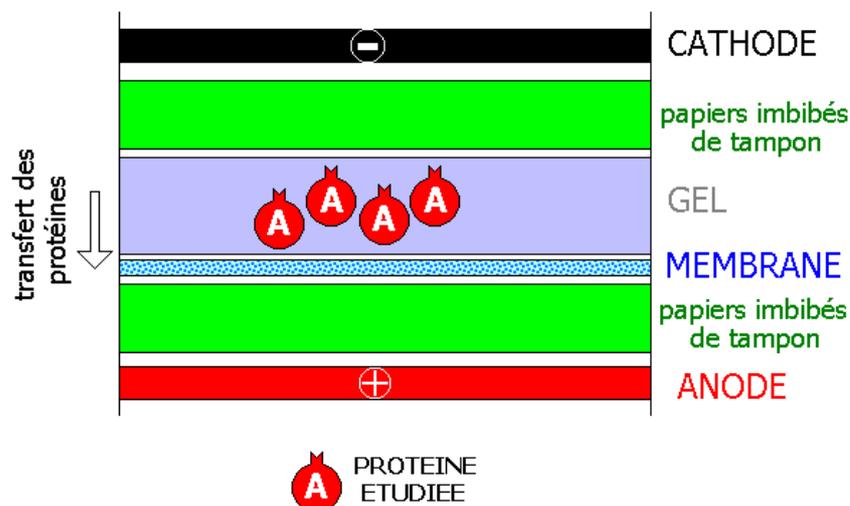


Figure 38 : Schéma de montage du « sandwich » de transfert.

Le support a été placé ensuite dans la cuve d'électro-transfert, un bloc de glace a été ajouté pour éviter une surchauffe liée à la présence des sels du tampon d'électrophorèse dans le gel. La cuve a été remplie avec du tampon de transfert de façon à recouvrir le support. Le générateur relié à la cuve a été réglé à un voltage de 100V pour une durée de transfert de 1h30.

3.4.4 Saturation ou blocage

3.4.4.1 Principe

La formation de liaisons non-spécifiques est un problème en Western-Blot. Plusieurs facteurs sont importants pour réduire le bruit de fond dans le produit final du western blot. Ces derniers permettront de donner des résultats plus clairs et d'éliminer les faux positifs. Pour cela, la membrane est incubée en présence de protéines "inertes" pour bloquer les sites de liaisons non occupés par la ou les protéines cibles. La BSA (bovin serum albumin) ou le lait non gras sont communément utilisés (Figure 39). La qualité des protéines utilisées pour le blocage est importante, les contaminants mineurs pouvant interférer avec les interactions antigènes anticorps.

Le bruit de fond peut encore être réduit en incluant un détergent anionique dans la solution de saturation : le Tween[®]20 (polyéthylène sorbitan monolaurate). Le Tween[®]20 minimise l'adsorption non-spécifique protéine-protéine et protéine-membrane en empêchant les interactions non-covalentes et hydrophobes. Il affecte peu les interactions antigènes-anticorps pour les étapes suivantes. Il agit comme supplément aux agents bloquants mais ne peut pas les substituer.

La membrane est lavée dans la solution de blocage pour limiter les liaisons non-spécifiques. Pour cela, les volumes de lavages doivent être suffisants pour créer un flux léger à la surface de la membrane. La température d'incubation de 4°C diminue considérablement le nombre de liaisons non spécifiques.

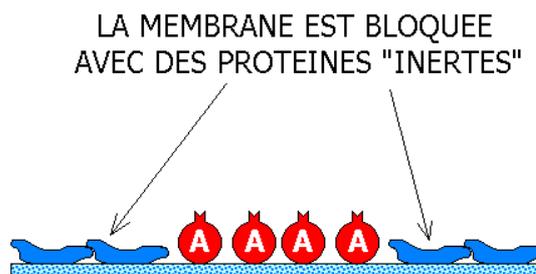


Figure 39 : Schéma illustratif de l'étape de blocage.

3.4.4.2 *Protocole expérimental*

Après l'électro-transfert, la membrane a été lavée pendant 15 minutes avec un tampon TBS (20mM Tris, 150mM NaCl, pH 8), auquel est ajouté 0,05% Tween[®]20. Cette étape permet d'éliminer le méthanol présent sur la membrane et de limiter ainsi les phénomènes de bruit de fond.

Ensuite la membrane a été mise à incuber dans le tampon de blocage composé de TBS/0,05%Tween[®]20 auquel est ajouté un pourcentage de 1 à 5% de caséine (lait écrémé). Les membranes ont été incubées pendant 1 à 3 heures en agitation douce à température ambiante ou toute la nuit à 4°C.

3.4.5 Détection par immuno-marquage

3.4.5.1 *Principe*

La meilleure méthode pour caractériser une protéine au milieu d'autres protéines contenues sur une membrane est l'immuno-marquage. La protéine joue le rôle d'un antigène face à des anticorps spécifiques (anticorps primaires) de cette protéine (Figure 40).

Une fois le complexe antigène-anticorps formé, sa détection se fait grâce à un deuxième anticorps (anticorps secondaire) spécifique des anticorps primaires. L'anticorps secondaire n'a pas besoin d'être aussi spécifique que l'anticorps primaire, mais on le choisit généralement en fonction de sa capacité à reconnaître une classe spécifique d'immunoglobulines (souvent IgG) de l'espèce animale d'où provient l'anticorps primaire.

L'anticorps secondaire est généralement lié à une enzyme comme la peroxydase de raifort (HRP) qui permettra l'identification visuelle sur la membrane de la protéine étudiée (Figure 41).

3.4.5.2 *Protocole expérimental*

- Incubation avec l'anticorps primaire

Après le blocage, la membrane a été incubée avec l'anticorps primaire d'intérêt dilué dans du tampon TBS/0,05% Tween[®]20 (Tableau 9). Le couplage s'effectue sur des durées différentes selon les anticorps (tableau 9) : en agitation lente à température ambiante sur des durées courtes (1-3h) et à 4°C pour des durées plus longues. La membrane a été ensuite lavée dans du TBS/0,05% Tween[®]20 par deux rinçages de 5 minutes et un rinçage de 15 minutes.

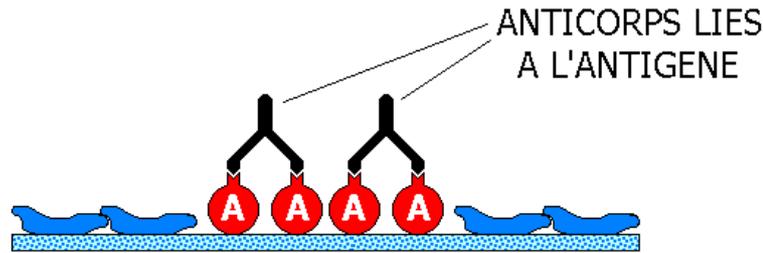


Figure 40 : Schéma illustratif de la fixation de l'anticorps primaire.

- Couplage avec l'anticorps secondaire

La membrane préalablement couplée à l'anticorps primaire a été incubée avec un anticorps secondaire conjugué à l'HRP, dilué dans du TBS/0,05%Tween[®]20 (Tableau 9).

La membrane en présence de l'anticorps secondaire a été mise en agitation douce pendant 1 ou 3 heures à température ambiante. La membrane a été ensuite lavée dans du TBS/0,05% Tween[®]20 par deux rinçages de 5 minutes et un rinçage de 15 minutes.

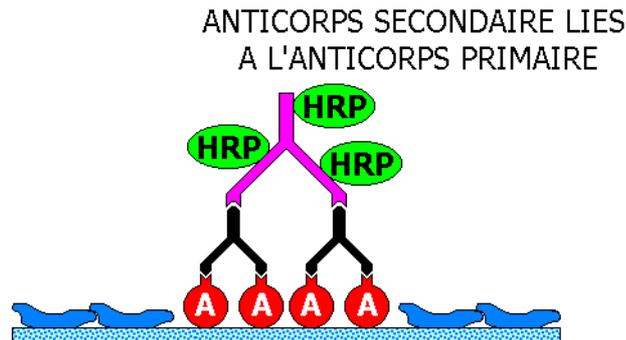


Figure 41 : Schéma illustratif de la fixation de l'anticorps secondaire conjugué.

3.4.6 Révélation par chimiluminescence

3.4.6.1 Principe

La chimiluminescence est un phénomène de réaction chimique ayant pour conséquence la production de lumière. En présence d'acide coumarique et en milieu alcalin, la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire catalyse l'oxydoréduction du luminol (5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione) par l'eau oxygénée (H₂O₂). La molécule oxydée passe d'un

état excité à un état plus stable en émettant des photons. Ces photons peuvent être détectés pendant plusieurs heures par exposition photographique.

3.4.6.2 Protocole expérimental

La membrane a été incubée pendant 1 minute dans un milieu de chimiluminescence (100 mM Tris, 225µM Acide Coumarique, 1,25mM Luminol, 0,015% H₂O₂ pH 8,8). La membrane a été placée ensuite entre deux films étirables dans une cassette opaque de révélation. Un film photographique a été exposé à la membrane (Kodak-ECL chimiluminescence). La durée d'exposition choisie correspond à la durée optimale pour avoir un signal suffisant et non saturé (10s à 5 min selon les conditions et l'anticorps). Le film a été alors développé par des lavages successifs dans des bains de développement et de fixation.

L'ensemble des conditions expérimentales est résumé dans le tableau 9 ci dessous :

	OXPPOS (Complexes V, III, IV, II, I)	PGC-1α
Poids moléculaire	Théorique et trouvé : CV : ~53 ; CIII : ~40 ; CIV : ~37 ; CII : ~30 ; CI : ~18 kDa	Théorique : ~92-105 kDa Trouvé : ~100 kDa
% gels	4% - 15 %	4% - 10 %
Concentration protéique	Mitochondrie Muscle : 2,5µg Homogénat Muscle et Foie : 20µg	Homogénat Muscle et Foie : 20µg
Electrophorèse	2h15 à 150V	1h à 150V
Transfert	1h30 à 100V	1h30 à 100V
Saturation	TBS-0,05% Tween [®] 20 + 5% lait ; 3h	TBS-0,05% Tween [®] 20 + 10% lait ; 1h
Rinçage	TBS-0,05% Tween [®] 20– 5'5'/15'	TBS-0,05% Tween [®] 20– 5'5'/15'
Anticorps primaire	Kit OXPPOS MS 604 (Mitosciences) 1,5mg/ml - 1/750 ^{ème} TBS-0,01% Tween [®] 20 + lait 1% ; Nuit à 4°C	Anti-PGC-1α (Calbiochem) 1/500 ^{ème} TBS-0,01% Tween [®] 20 + lait 5% ; 3h TA
Rinçage	TBS-0,05% Tween [®] 20– 5'5'/15'	TBS-0,05% Tween [®] 20– 5'5'/15'
Anticorps secondaire	Anti-souris 1/10000 ^{ème} TBS-0,05% Tween [®] 20 ; 2h	Anti-lapin 1/1000 ^{ème} TBS-0,05% Tween [®] 20 ; 2h
Rinçage	TBS-0,05% Tween [®] 20– 5'5'/15'	TBS-0,05% Tween [®] 20– 5'5'/15'
Chimiluminescence	Acide coumarique, Luminol, 30% H ₂ O ₂ ; 1 min	Acide coumarique, Luminol, 30% H ₂ O ₂ ; 1 min
Exposition	10 à 30 secondes	2 à 5 minutes

Tableau 9 : Tableau de synthèse de la détection protéique par Western Blot.

3.4.7 Analyse densitométrique

Après localisation de la protéine d'intérêt à son poids moléculaire théorique, par comparaison avec le standard déposé dans le gel et transféré sur la membrane. Les films ont été scannés et les signaux ont été quantifiés de façon relative à l'aide d'un logiciel d'analyse densitométrique (ImageJ 1.37v, NIH USA).

3.5 Mesure du stress oxydant

3.5.1 Préparation des homogénats

Les échantillons de muscle et de foie ont été broyés à 4°C à l'aide d'un broyeur de tissu en verre à raison de 100 mg de tissu pour 1mL de milieu d'homogénéisation (10 mM Tris-Base, 1 mM Acide Diéthylène TriaminePenta (DTPA), 1 mM acide PhenylMethylSulFonyl (PMSF)). Les broyats ont été ensuite centrifugés à 3300 g pendant 10 min à 4°C. Les surnageants ainsi obtenus ont été récupérés et congelés à -80°C.

Pour la mesure du glutathion, 600µL de surnageant ont été ajoutés à 120 µL d'Acide MétaPhosphorique (MPA) (rapport 5/1). Les homogénats ont été laissés à précipiter dans la glace avant d'être centrifugés à 1700 g pendant 10 min à 4°.

Les mesures de la peroxydation lipidique, d'oxydation des protéines et de glutathion ont été réalisées selon les techniques de routine présente au laboratoire.

3.5.2 Péroxydation des lipides par mesure des TBARS

3.5.2.1 Principe

La mesure des TBARS (Thiols Barbituric Acid Reactive Species) est effectuée selon la méthode d'(Ohkawa et coll., 1979) adapté par (Richard et coll., 1992).

La réaction de dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud du malondialdéhyde avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA). Le MDA-(TBA)₂, produit de la réaction, est un pigment absorbant à 532 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol. La réaction colorée, observée avec l'acide thiobarbiturique, mesure non seulement le malondialdéhyde préexistant, mais aussi le malondialdéhyde formé de manière artefactuelle par décomposition thermique des peroxydes, et de ceux générés au cours même de la réaction.

Le malondialdéhyde étant une molécule instable ne pouvant constituer un standard, Le 1,1,3,3 tétraéthoxypropane (TEP) est alors utilisé.

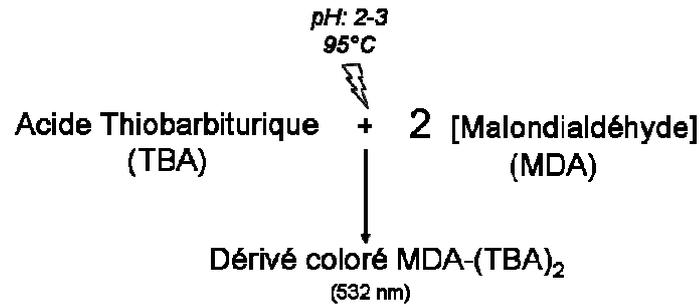


Figure 42 : Principe réactionnel du dosage des TBARS

3.5.2.2 Protocole expérimental

La calibration a été obtenue à partir d'une solution de 1,1,3,3-TétraÉthoxyPropane (TEP). La courbe standard a été réalisée avec des concentrations de TEP allant de 1 à 8 μM . Pour la calibration et les homogénats, les échantillons ont été mis dans des cupules en présence d'un mélange contenant deux volumes d'acide thiobarbiturique (TBA) à 0,8% pour un volume d'acide perchlorique (HClO_4) à 7%. Les échantillons ont été ensuite placés dans un bain-marie à 95°C pendant 1h. Au cours de la réaction, deux molécules d'acide thiobarbiturique réagissent avec une molécule de MDA pour former un pigment rose : le MDA-(TBA)₂.

Pour arrêter rapidement la réaction, les tubes ont été placés dans la glace. Pour l'extraction du système coloré MDA-(TBA)₂, 800 μl de n-butanol ont été ajoutés à chaque tube. Les tubes ont été alors vortexés vigoureusement pour séparer les phases, laissés à décanter et centrifugés à 2000g pendant 10min.

Enfin, la phase supérieure (organique) a été récupérée et transférée dans une cuvette pour mesure par fluorimétrie. ($\lambda_{\text{excitation}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 553 \text{ nm}$). Les résultats ont été exprimés en $\mu\text{mol/mg}$ de protéines.

3.5.3 Oxydation des protéines par mesure des thiols

3.5.3.1 Principe

Les Thiols sont dosés selon la méthode d'Ellman (1959) modifiée par (Bulaj et coll., 1998). Le principe du dosage de l'oxydation des protéines est basé sur la mesure des groupements sulfhydryle -SH réagissant avec le 5,5'-DiThiobis (2-acide NitroBenzoïque)

(DTNB) pour former un composé TNB coloré ($\lambda = 412 \text{ nm}$) dans un rapport stœchiométrique 1:1. Le N-Acetyl Cystéine (NAC) utilisé comme complément alimentaire est le composé thiol utilisé comme standard.

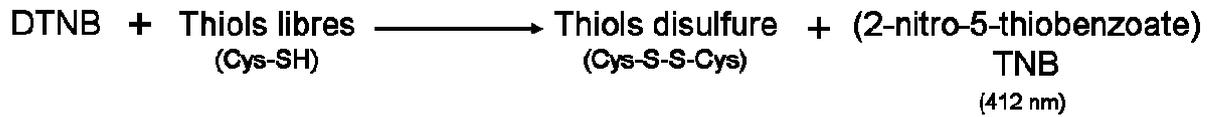


Figure 43 : Principe réactionnel du dosage des Thiols

3.5.3.2 Protocole expérimental

Une courbe de calibration a été préparée à partir d'une gamme de concentration de NAC allant de 0,125 à 0,6mmol. La courbe standard a été traitée dans les mêmes conditions que les échantillons.

La mesure par spectrophotométrie des échantillons a été réalisée par addition des homogénats dans un tampon contenant 50 mM Kpi ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$), 1mM EDTA et 2,5mM DTNB, pH 8. Après agitation, les échantillons ont été incubés pendant 5 min à 37°C. La mesure d'absorbance à 412 nm a été réalisée sur 3 min. Les résultats ont été exprimés en $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines.

3.5.4 Glutathion

3.5.4.1 Principe

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

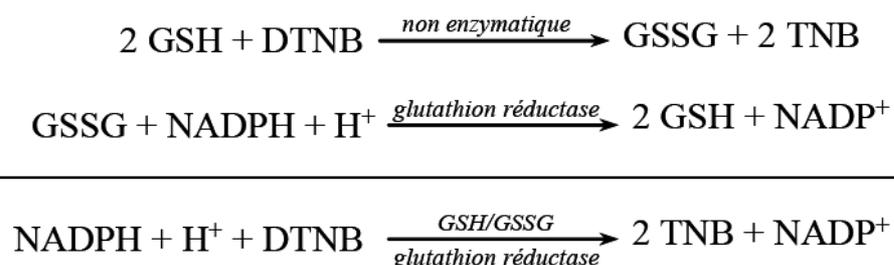


Figure 44 : Equation réactionnel du principe de dosage du glutathion.

3.5.4.2 Protocole expérimental

Les homogénats déprotéinés par le MPA ont été neutralisés par une solution tampon composée de 0,4 M MOPS et de 2 mM EDTA, pH 6,75. Ils sont ensuite dosés par la méthode d'Akerboom et Sies, 1981).

3.6 Mesure des défenses antioxydantes

3.6.1 Activité Glutathion peroxydase (GPX)

3.6.1.1 Principe

Le dosage de la GPX est basé sur une réaction couplée entre la glutathion peroxydase et la glutathion réductase (Flohe et Gunzler, 1984).

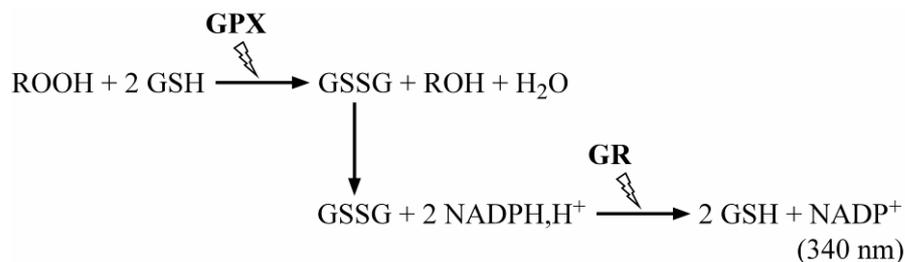


Figure 45 : Principe réactionnel du dosage de la GPX.

La cinétique de disparition du NADPH, H^+ est suivie par spectrophotométrie à 340 nm. Une unité enzymatique de glutathion peroxydase est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour oxyder 1 μmol de GSH/min. Elle correspond ainsi à 0,5 μmol de NADPH, H^+ oxydé par minute.

3.6.1.2 Protocole expérimental

Le milieu réactionnel est composé de 0,2974 U/ml glutathion réductase, 1,25 mM GSH, 0,1875 mM NADPH, H^+ , 100 mM phosphate de potassium, EDTA 10mM. L'activité non spécifique est déterminée par mesure de la densité optique pendant 4 min après l'addition d'un échantillon d'homogénat. La réaction débute par addition de 12mM de t-butyl hydroperoxyde. Après agitation, une seconde lecture de DO est lancée pendant 4 minutes

permettant de mesurer l'activité spécifique de la réaction qui est exprimée en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de tissu.

3.6.2 Activité Superoxyde dismutase (SOD)

3.6.2.1 Principe

La mesure de l'activité de la SOD est effectuée de manière indirecte en spectrophotométrie. Elle utilise un système xanthine/xanthine oxydase comme producteur d' O_2^- et le cytochrome c oxydé comme accepteur. La réduction du cytochrome c par l' O_2^- est mesurée à 550 nm. La SOD présente dans l'échantillon à doser entre en compétition pour l'utilisation du O_2^- et donc limite la réduction du cytochrome c.

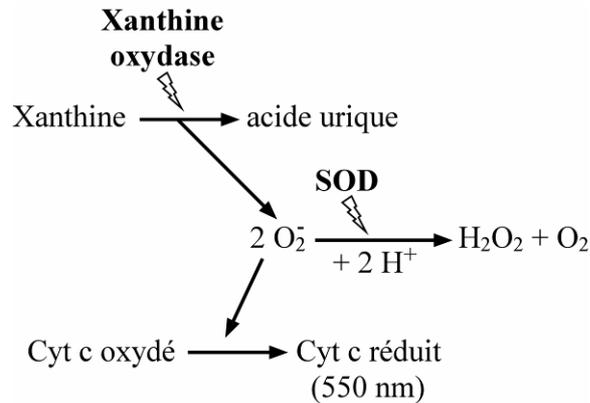


Figure 46 : Principe réactionnel du dosage de la SOD.

3.6.2.2 Protocole expérimental

La mesure de l'activité totale est effectuée dans un tampon de réaction (0,5mM xanthine, 0,2 mM cytochrome c, 100 mM phosphate de potassium, 10 mM EDTA, pH 7,8) à 25°C. L'activité de la forme mitochondriale de la SOD est mesurée après addition de cyanure 1mM. L'activité de la forme cytosolique est calculée en retranchant l'activité de la SOD mitochondriale à l'activité SOD totale. Une gamme étalon de SOD est effectuée dans les mêmes conditions. Une unité d'activité de SOD est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber de 50 % la réduction du cytochrome c oxydé. Les activités sont exprimées en U SOD/ mg de protéines totales.

3.7 Statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne pour chaque condition, \pm l'erreur standard à la moyenne (SEM). Les comparaisons entre échantillons ont été faites à l'aide de tests ANOVA à analyse factorielle. Le test de Fisher a été utilisé à posteriori pour déterminer les interactions entre les groupes. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel StatView (*StatView, SAS insitute inc. Version 5.0*). Un seuil de significativité à 5% a été choisi.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

RESULTATS ET DISCUSSIONS

La première partie de cette étude a eu pour but de mettre au point au sein du laboratoire une technique sensible de mesure par fluorimétrie de la production d'H₂O₂ en parallèle de mesures plus classiques d'oxygraphie.

Cette mise au point expérimentale nous a permis d'explorer la mitochondrie dans différentes situations d'exercice. Dans une première partie, les résultats obtenus portent sur les effets de l'exercice unique sur les adaptations de la chaîne respiratoire mitochondriale. Dans la seconde partie, les résultats traitent des adaptations mitochondriales acquises par une activité physique régulière. Enfin la dernière partie de ce travail évoque le rôle du coactivateur transcriptionnel PGC-1 α , reconnu pour son implication dans la biogenèse mitochondriale et dans les adaptations fonctionnelles des complexes respiratoires impliqués dans l'oxydation phosphorylante.

1 Mise au point expérimentale

1.1 Mesure de la consommation d'oxygène

La méthodologie de mesure oxygraphique de consommation d'oxygène sur mitochondries isolées révèle des conditions expérimentales très éclectiques. Des études antérieures réalisées au laboratoire ont utilisé des milieux de respiration Tris-EGTA contenant un support osmotique variable, saccharose (250mM) ou chlorure de potassium (KCl : 125mM), à des températures variées de 25°C, 30°C ou 37°C (Fontaine et coll., 1996, Garait, 2006, Nogueira et coll., 2001).

Pour nos expérimentations, nous avons choisi les conditions expérimentales permettant de réaliser nos mesures d'oxygraphie et de production d'H₂O₂ mitochondriale en parallèle, dans les mêmes milieux réactionnels. A travers nos conditions expérimentales, le but a été de faire émerger le plus grand nombre de mécanismes d'adaptations liés à l'exercice. Nous avons donc dû réaliser le compromis d'optimiser le signal tout en restant au plus près de la physiologie cellulaire.

Le support osmotique des mitochondries in situ est essentiellement ionique et plus particulièrement composé de potassium. Dans un milieu ionique, de type KCl, l'oxydation

phosphorylante n'est pas régulée de la même manière que dans un milieu saccharose (Devin et coll., 1997). Cette étude fait apparaître qu'en milieu KCl, la réponse du flux de consommation d'oxygène aux forces qui lui sont associées (force protomotrice, potentiel redox, potentiel phosphate) est modifiée en faveur d'une redistribution du contrôle cinétique plus important de la chaîne respiratoire par rapport au transporteur de nucléotides adényliques.

Dans ces conditions il nous est apparu intéressant de mesurer les paramètres de l'oxydation phosphorylante en milieu KCl pour étudier les effets de l'activité physique sur les complexes de la chaîne respiratoire.

Dans une étude publiée en 2006, Marcil et coll. ont choisi de mesurer la consommation d'oxygène de mitochondries cardiaques en milieu KCl et à une température de 22°C (Marcil et coll., 2006). Ceux-ci ne relèvent alors aucune différence liée à l'entraînement en endurance. Il a été montré qu'une augmentation de la température d'incubation des mitochondries au delà de la valeur de 25°C, évoquée comme classique (Fontaine et coll., 1996, Starnes et coll., 2007), induit une augmentation de la conductance aux protons de la membrane mitochondriale interne (Canton et coll., 1995) augmentant ainsi les vitesses respiratoires à l'état 2. Ce dernier paramètre pourrait donc nous permettre de relever d'éventuelles adaptations liées à l'activité physique. Cependant, les derniers travaux du laboratoire considèrent qu'une température de 37°C altère de façon trop importante la perméabilité mitochondriale et rend difficile les successions de mesures. Nous avons donc fait le choix d'une température d'incubation de 30°C pour maintenir des activités respiratoires optimales.

1.2 Mesure de la production radicalaire

Les espèces réactives de l'oxygène, espèces radicalaires sur lesquelles nous nous sommes focalisés dans notre étude, existent au niveau tissulaire à des concentrations très faibles (de 10^{-4} à 10^{-9} M). Ceci implique l'utilisation de techniques de mesures très sensibles (Batandier et coll., 2002).

Il ressort de la littérature que la mesure directe originelle ayant permis de relever une augmentation au niveau tissulaire de la production de radicaux libres à l'exercice était la résonance électronique de spin ou EPR (electron paramagnetic resonance) (Davies et coll.,

1982). Cette méthode de spectroscopie sous champ magnétique permet d'étudier avec grande spécificité et sensibilité les composés chimiques possédant un ou plusieurs électrons appariés tels que le sont les radicaux libres. Cependant ce matériel onéreux et rare dans les laboratoires de biologie, associé à une procédure basée sur des concepts physiques complexes, ont incité les chercheurs en biologie à développer des méthodes de mesures alternatives. De plus, dans nos expérimentations, cette méthode ne nous aurait pas permis d'appréhender les mécanismes d'adaptations de la production de radicaux libres et d'identifier les effets de l'exercice sur la production différenciée des complexes de la chaîne respiratoire.

La mesure de production d'espèces radicalaires au niveau cellulaire peut être réalisée en fluorimétrie par l'intermédiaire d'une sonde fluorescente sensible à l'oxydation par les radicaux libres (Batandier et coll., 2002). La sonde « traditionnellement » utilisée dans la majorité des études est la 2-7 dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Bejma et Ji, 1999, Radak et coll., 2004, Reid et coll., 1992). Le principal intérêt de cette méthode est sa relative simplicité d'utilisation. Cependant elle est limitée par une faible spécificité et photostabilité. Cette méthode permet plus d'obtenir des indications globales sur le stress oxydant cellulaire qu'une estimation de la production d' H_2O_2 intracellulaire (Soh, 2006, Tarpey et Fridovich, 2001).

Dans la première partie de nos recherches, nous nous sommes confrontés à l'utilisation de cette sonde. Sur hépatocytes isolés, nous avons rencontré de nombreux biais méthodologiques impliquant des interférences avec les substrats et inhibiteurs de la chaîne respiratoire et des temps de réponses de la sonde très lents. Nous avons donc préféré mettre de côté cette approche et nous intéresser à la mesure cinétique directe, au niveau de préparations mitochondriales, limitant ainsi de façon supplémentaire l'influence importante de l'environnement antioxydant de la cellule.

De part la forte instabilité de la majorité des composés radicalaires (10^{-3} à 10^{-9} sec), et de l'impossibilité pour l'anion superoxyde de diffuser à travers la membrane mitochondriale interne, c'est l' H_2O_2 , molécule suffisamment stable pour oxyder les sondes fluorescentes, qui est utilisé pour quantifier la production radicalaire. Dans la littérature, les études réticentes à l'utilisation de la DCFH utilise l'acide homovanilique (HVA) pour la mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène au niveau mitochondrial (Marcil et coll., 2006, Molnar et coll., 2006, Servais et coll., 2003, Venditti et coll., 2007, Venditti et coll., 1999). Marcil et coll. en 2006 montrent sur mitochondries cardiaques, incubées avec de l'HVA, que l'entraînement n'influence pas de façon significative la production de ROS avec des substrats

du complexe I ou du complexe II. En utilisant cette technique, Venditti en 1999 font apparaître sur mitochondries musculaires énergisées avec du Pyruvate/Malate, fournissant du NADH, une diminution de la production d' H_2O_2 à la suite d'un entraînement en endurance. Servais dans sa thèse publiée en 2004 utilise également cette sonde et fait apparaître qu'il n'est pas possible de mesurer la production d' H_2O_2 avec la sonde HVA en présence de substrat spécifique du complexe I du fait d'une interférence avec le pyruvate/malate et d'une augmentation de fluorescence non spécifique liée au substrat lui même (Servais, 2004). Il rapporte que cela a déjà été révélé par des travaux antérieurs (St-Pierre et coll., 2002).

Le problème technique le plus répandu dans la détection fluorimétrique de composés radicalaires est l'amortissement de fluorescence (quenching) qui résulte d'une interaction entre deux chromophores et qui peut avoir pour conséquence une perte de signal importante. Sur ce point, il a été montré par des essais réalisés au laboratoire (Batandier, non publié) que les longueurs d'onde utilisées pour la détection de cette sonde ($\lambda_{\text{excitation}} = 312 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 420 \text{ nm}$) interféraient avec l'autofluorescence du NADH ($\lambda = 340 \text{ nm}$). De ce fait après plusieurs expériences réalisées en présence d'HVA, nous avons cherché une sonde spécifique de l' H_2O_2 nous permettant de limiter les biais expérimentaux de type « quenching ». Nous avons alors sélectionné l'Amplex Red, sonde parallèlement utilisée dans les publications de ces dernières années (Chen et coll., 2003, Schonfeld et Wojtczak, 2007, Starnes et coll., 2007). Chen et coll. en 2003, montrent que l'addition de superoxyde dismutase dans leurs conditions de mesures sur mitochondries, en présence d'Amplex Red, n'induit pas d'augmentation du signal de fluorescence. Ils confirment alors que la dismutation de l'anion superoxyde en H_2O_2 est suffisamment rapide et complète pour oxyder la sonde. L'adjonction de catalase dans le milieu confirme la spécificité et le faible bruit de fond de la sonde en faisant décroître la fluorescence d'environ 90%. Dans une étude réalisée sur mitochondries cardiaques, Starnes et coll. montrent que la production de ROS, évaluée en point final, est diminuée de 11% à la suite d'un entraînement en endurance (Starnes et coll., 2007). Nous constatons qu'il est donc possible de révéler des variations fines de production par l'intermédiaire de cette méthode robuste.

L'utilisation de cette sonde pouvant être réalisée en milieu KCl et à 30°C , nous avons choisi de réaliser nos mesures fluorimétriques de production d' H_2O_2 avec l'Amplex Red dans des conditions expérimentales similaires à l'oxygraphie.

2 Modifications de l'activité mitochondriale induites par l'exercice unique

Pour faciliter la lecture des résultats, la chaîne respiratoire mitochondriale est représentée sur un feuillet ouvrable en Annexe.

Cette première partie de résultats a eu pour objectif principal d'évaluer les effets d'un exercice unique d'intensité modérée (travail correspondant à environ 75% de VO_{2max}) sur le fonctionnement mitochondrial. Pour cela nous avons étudié en parallèle les paramètres de consommation d'oxygène et de production d' H_2O_2 estimant la production de radicaux libres. Le but est d'observer si les dommages cellulaires et processus de signalisations observés en fin d'exercice et au cours de la récupération peuvent être liés à une production radicalaire modifiée. Nous avons pour cela comparé à un groupe contrôle, les effets d'un exercice unique sur 2 groupes de rats : sacrifiés dès la fin de l'exercice (Exercice t^{0h}) ou 2 heures après la fin de celui-ci (Exercice t^{+2h}).

2.1 Consommation d'oxygène et exercice unique

2.1.1 Consommation d'oxygène des mitochondries musculaires

2.1.1.1 Effets du substrat sur la consommation d'oxygène de mitochondries musculaires

La respiration basale (état 2) en succinate est 3 fois plus importante que celle obtenue avec le glutamate/malate (G/M) (Tableau 10). Les valeurs de respiration en présence des 2 substrats conjugués ne diffèrent pas des valeurs de respirations obtenues avec le succinate seul. Nous obtenons des valeurs semblables entre les respirations en G/M et en palmitoyl-L-carnitine (PC) (idem pour l'état 4). Après addition d'ADP, la respiration en état phosphorylant (état 3) est plus importante en G/M qu'en succinate. Le contrôle respiratoire est lui 4 fois plus important en G/M qu'en succinate.

		Muscle		
		Contrôle	Exercice t ^{0h}	Exercice t ^{+2h}
Glutamate/Malate	<i>Etat 2</i>	29,0 ± 1,6	29,6 ± 1,6	32,0 ± 2,8
	<i>Etat 3</i>	472,5 ± 29,3	528,7 ± 58,1	505,6 ± 36,4
	<i>Etat 4</i>	21,2 ± 0,8	23,6 ± 5,0	25,0 ± 2,8
	<i>RCR</i>	21,5 ± 1,7	24,6 ± 2,8	22,1 ± 1,2
Succinate	<i>Etat 2</i>	90,7 ± 4,5	94,6 ± 3,8	97,2 ± 1,3
	<i>Etat 3</i>	371,7 ± 12,17	382,8 ± 21,0	428,8 ± 16,2
	<i>Etat 4</i>	75,5 ± 4,3	80,0 ± 2,3	77,8 ± 5,4
	<i>RCR</i>	5,0 ± 0,1	4,8 ± 0,2	5,6 ± 0,3 #
Glutamate/Malate/ Succinate	<i>Etat 2</i>	88,3 ± 3,8	122,0 ± 16,1 *	102,2 ± 2,1
	<i>Etat 3</i>	578,3 ± 19,1	760,3 ± 70,5 *	707,4 ± 37,1
	<i>Etat 4</i>	76,3 ± 4,4	92,2 ± 13,0	84,2 ± 3,2
	<i>RCR</i>	7,7 ± 0,4	8,5 ± 0,7	8,7 ± 0,6
Palmitoyl-L-Carnitine	<i>Etat 2</i>	36,8 ± 3,5	38,8 ± 3,6	35,8 ± 3,6
	<i>Etat 3</i>	218,5 ± 22,2	294,7 ± 25,8 *	331,3 ± 23,6 *
	<i>Etat 4</i>	24,3 ± 1,1	22,0 ± 1,4	23,3 ± 1,2
	<i>RCR</i>	9,1 ± 1,1	12,9 ± 1,8	14,3 ± 1,0 *
TMPD/Asc + DNP		1007,3 ± 58,7	1243,0 ± 123,0	1274,8 ± 72,7

Tableau 10: Effet du délai post-exercice sur la consommation d'oxygène (nmol d'O/min/mg prot), le contrôle respiratoire (RCR) et l'activité de la cytochrome oxydase (TMPD/Asc+DNP) de mitochondries de muscle provenant de rats contrôles, exercés pendant 60 min et sacrifiés dès la fin de l'exercice (Exercice t^{0h}) ou exercés pendant 60 min et sacrifiés 2h après la fin de cet exercice (Exercice t^{+2h})

Les mitochondries de muscle (0,2 mg/ml) ont été incubées à 30°C dans le milieu suivant : 125mM KCl, 1 mM EGTA, 20 mM Tris, 0,15% BSA délipidée, 5mM Pi-Tris, pH 7,2 et supplémentées avec 4 sortes de conditions respiratoires : soit glutamate/malate (5,5/2,5mM), soit succinate/roténone (5,5mM/2,5µM), soit glutamate/malate/succinate (5,5/2,5/5,5mM), soit palmitoyl-L-carnitine/malate (55µM/1mM). La respiration à l'état 3 a été obtenue après addition de 300µM d'ADP et la respiration à l'état 4, après addition de 1,25µg/ml d'oligomycine. Le RCR (Respiratory Control Ratio) est obtenu par le rapport de l'état 3 sur l'état 4. L'activité de la cytochrome oxydase est évaluée par l'addition de TMPD/Ascorbate (0,5/2,5mM), Antimycine A (1,5µM) et DNP (75µM). Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM avec n=8, * Différent du groupe contrôle ; # Différent du groupe Exercice t^{0h} (p < 0,05)

2.1.1.2 Effets du délai post-exercice sur la consommation d'oxygène de mitochondries musculaires

La respiration à l'état 2 est inchangée lorsqu'on alimente séparément les complexes avec du G/M ou du succinate quelque soit le délai post exercice étudié (Tableau 10).

La respiration à l'état 2 mesurée avec un fonctionnement global de la chaîne, en couplant les substrats glutamate/malate + succinate (G/M/S), est significativement supérieure (+ 38%, $p < 0,05$) dans le groupe Exercice t^{0h} par rapport au groupe contrôle. Cette différence n'est pas mise en évidence lors de l'utilisation d'acides gras (Tableau 10).

La respiration à l'état 3 n'est pas différente entre les 3 groupes, lorsqu'on utilise les substrats, G/M ou succinate séparément. La respiration en G/M/S est significativement supérieure (+ 31%, $p < 0,05$) dans le groupe Exercice t^{0h} par rapport au groupe contrôle et tend à l'être dans le groupe Exercice t^{+2h} (+22% ; $p < 0,052$). La respiration en présence d'acides gras est statistiquement supérieure dans le groupe Exercice t^{0h} (+35%, $p < 0,05$) et dans le groupe Exercice t^{+2h} (+52%, $p < 0,05$) par rapport au groupe contrôle (Tableau 10).

La respiration à l'état 4, en présence d'oligomycine n'est pas différente entre les 3 groupes (Tableau 10).

Le RCR (état 4/état 3), contrôle respiratoire, est significativement supérieur en présence de PC dans le groupe Exercice t^{+2h} par rapport au groupe contrôle et dans le groupe Exercice t^{+2h} par rapport au groupe Exercice t^{0h} en présence de succinate (Tableau 10).

L'activité de la cytochrome oxydase déterminée par oxygraphie (TMPD/Asc+DNP) n'est pas différente entre les groupes (Tableau 10).

2.1.2 Consommation d'oxygène des mitochondries hépatiques

2.1.2.1 Effets du substrat sur la consommation d'oxygène de mitochondries hépatiques

La respiration à l'état 2 en présence de succinate est doublée par rapport à la respiration en présence de glutamate/malate (Tableau 11). La respiration en G/M/S est similaire à la respiration obtenue en succinate seul. La respiration en présence de PC similaire à celle mesurée en présence de G/M est deux fois plus faible que la respiration en G/M/S. La respiration en état phosphorylant est inférieure lorsqu'on utilise du G/M par rapport au succinate.

		Foie		
		Contrôle	Exercice t ^{0h}	Exercice t ^{+2h}
Glutamate/Malate	<i>Etat 2</i>	9,23 ± 0,79	10,28 ± 2,47	11,13 ± 1,11
	<i>Etat 3</i>	123,23 ± 10,99	127,95 ± 25,63	135,93 ± 10,51
	<i>Etat 4</i>	7,77 ± 1,56	8,13 ± 1,55	7,88 ± 1,53
	<i>RCR</i>	16,14 ± 1,70	16,00 ± 2,91	17,95 ± 4,37
Succinate	<i>Etat 2</i>	22,10 ± 1,22	22,33 ± 2,14	22,03 ± 0,76
	<i>Etat 3</i>	160,83 ± 6,54	164,25 ± 13,08	170,69 ± 5,26
	<i>Etat 4</i>	14,60 ± 1,94	17,80 ± 1,87	16,51 ± 0,58
	<i>RCR</i>	12,26 ± 2,53	9,56 ± 0,75	10,54 ± 0,38
Glutamate/Malate/ Succinate	<i>Etat 2</i>	24,60 ± 0,64	24,15 ± 2,46	24,89 ± 0,38
	<i>Etat 3</i>	164,77 ± 5,42	168,40 ± 16,05	182,43 ± 8,82
	<i>Etat 4</i>	17,27 ± 1,30	16,71 ± 1,56	18,23 ± 1,47
	<i>RCR</i>	9,80 ± 0,88	9,89 ± 0,60	10,25 ± 0,64
Palmitoyl-L-Carnitine	<i>Etat 2</i>	11,33 ± 0,60	11,78 ± 0,91	12,70 ± 0,34
	<i>Etat 3</i>	77,73 ± 5,61	89,63 ± 12,05	100,55 ± 5,63
	<i>Etat 4</i>	9,53 ± 0,37	9,88 ± 0,68	9,70 ± 0,20
	<i>RCR</i>	8,15 ± 0,50	9,05 ± 0,96	10,38 ± 0,59
TMPD/Asc + DNP		216,43 ± 11,13	215,38 ± 15,84	222,43 ± 14,68

Tableau 11 : Effet du délai post-exercice sur la consommation d'oxygène (nmol d'O/min/mg prot), le contrôle respiratoire (RCR) et l'activité de la cytochrome oxydase (TMPD/Asc+DNP) de mitochondries de foie provenant de rats contrôles, exercés pendant 60 min et sacrifiés dès la fin de l'exercice (Exercice t^{0h}) ou exercés pendant 60 min et sacrifiés 2h après la fin de cet exercice (Exercice t^{+2h})

Les mitochondries de foie (0,5 mg/ml) ont été incubées à 30°C dans le milieu suivant : 125mM KCl, 1 mM EGTA, 20 mM Tris, 0,15% BSA délipidée, 5mM Pi-Tris, pH 7,2 et supplémentées avec 4 sortes de conditions respiratoires : soit glutamate/malate (5,5/2,5mM), soit succinate/roténone (5,5mM/2,5µM), soit glutamate/malate/succinate (5,5/2,5/5,5mM), soit palmitoyl-L-carnitine/malate (55µM/1mM). La respiration à l'état 3 a été obtenue après addition de 300µM d'ADP et la respiration à l'état 4, après addition de 1,25µg/ml d'oligomycine. Le RCR (Respiratory Control Ratio) est obtenu par le rapport de l'état3 sur l'état 4. L'activité de la cytochrome oxydase est évaluée par l'addition de TMPD/Ascorbate (0,5/2,5mM), Antimycine A (1,5µM) et DNP (75µM). Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM avec n=8. * Différent du groupe contrôle (p < 0,05).

2.1.2.2 Effets du délai post-exercice sur la consommation d'oxygène de mitochondries hépatiques

Les respirations et l'activité de la cytochrome oxydase ne sont pas influencées par l'exercice unique au niveau hépatique (Tableau 11).

2.2 Production radicalaire et exercice unique

2.2.1 Production radicalaire des mitochondries musculaires

		Muscle		
		Contrôle	Exercice t ^{0h}	Exercice t ^{+2h}
Glutamate/Malate	<i>Etat 2</i>	63,26 ± 8,90	66,71 ± 6,85	54,66 ± 2,57
	<i>Etat 3</i>	14,92 ± 3,54	47,56 ± 4,49 *	33,60 ± 1,54 *#
	<i>Roténone</i>	58,64 ± 5,86	153,01 ± 26,55 *	86,69 ± 11,41 #
	<i>AA</i>	80,79 ± 7,08	523,11 ± 97,83 *	301,58 ± 25,38 *#
Succinate	<i>Etat 2</i>	2232,68 ± 295,85	2704,73 ± 300,70	2084,42 ± 232,08
	<i>Etat 3</i>	20,42 ± 2,18	1,27 ± 0,84 *	0 ± 0 *
	<i>Roténone</i>	39,25 ± 5,08	123,65 ± 23,34 *	90,01 ± 12,32 *
	<i>AA</i>	61,54 ± 4,05	415,60 ± 48,67 *	342,55 ± 9,63 *
Glutamate/Malate/ Succinate	<i>Etat 2</i>	1849,14 ± 287,93	2311,48 ± 253,55	2046,19 ± 170,82
	<i>Etat 3</i>	30,38 ± 4,08	90,88 ± 13,73 *	70,62 ± 7,21 *
	<i>Roténone</i>	66,85 ± 5,41	187,03 ± 35,34 *	159,84 ± 11,63 *
	<i>AA</i>	94,85 ± 5,67	486,20 ± 68,53 *	441,01 ± 34,15 *
Palmitoyl-L-Carnitine	<i>Etat 2</i>	69,78 ± 7,79	86,58 ± 12,71	70,57 ± 4,52
	<i>Etat 3</i>	41,60 ± 4,20	36,51 ± 7,69	35,73 ± 5,28
	<i>Roténone</i>	61,93 ± 6,63	67,46 ± 12,81	47,55 ± 4,44
	<i>AA</i>	93,33 ± 7,42	342,35 ± 49,37 *	243,75 ± 20,50 *#

Tableau 12 : Effet du délai post-exercice sur la production de peroxyde d'hydrogène (pmol d'H₂O₂/min/mg prot) de mitochondries de muscle provenant de rats contrôles, exercés pendant 60 min et sacrifiés dès la fin de l'exercice (Exercice t^{0h}) ou exercés pendant 60 min et sacrifiés 2h après la fin de cet exercice (Exercice t^{+2h})

Les mitochondries de muscle (0,2 mg/ml) ont été incubées à 30°C dans le milieu suivant : 125mM KCl, 1 mM EGTA, 20 mM Tris, 0,15% BSA délipidée, 5mM Pi-Tris, pH 7,2 en présence de 1µM d'Amplex Red, 6U/ml d'HRP et supplémentées avec 4 conditions de substrats : soit glutamate/malate (5,5/2,5mM), soit succinate/roténone (5,5mM/2,5µM), soit glutamate/malate/succinate (5,5/2,5/5,5mM), soit palmitoyl-L-carnitine/malate (55µM/1mM). La production d'H₂O₂ à l'état 3 a été obtenue après addition de 300µM d'ADP. L'addition de 1,25µM de roténone permet d'inhiber le complexe I et l'addition de 1,5µM d'Antimycine A, le complexe III. Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM avec n=8. * Différent du groupe contrôle, # Différent du groupe Exercice t^{0h} (p < 0,05).

2.2.1.1 Effets du substrat sur la production d'H₂O₂ de mitochondries musculaires

La production d' H_2O_2 en présence de succinate ou de G/M/S est plus de 30 fois supérieure à celle mesurée avec du G/M ou du PC (Tableau 12).

L'état phosphorylant inhibe la production de ROS avec l'ensemble des substrats (Tableau 12).

2.2.1.2 Effets du délai post exercice sur la production d' H_2O_2 de mitochondries musculaires

La production mitochondriale d' H_2O_2 n'est pas différente entre les 3 groupes à l'état 2, quelques soient les substrats respiratoires (Tableau 12).

En présence de G/M, la production d' H_2O_2 à l'état 3 est significativement supérieure dans les groupes Exercice t^{0h} (+219%, $p < 0,05$) et Exercice t^{+2h} (+125%, $p < 0,05$) par rapport au groupe contrôle (Tableau 12). La production mesurée dans le groupe Exercice t^{0h} est supérieure (+42%, $p < 0,05$) par rapport au groupe Exercice t^{+2h} . L'ajout de roténone, inhibant le complexe I, révèle une production supérieure pour les groupes Exercice t^{0h} (+161%, $p < 0,05$) par rapport au groupe contrôle. La production du groupe Exercice t^{0h} est supérieure (+76%, $p < 0,05$) par rapport au groupe Exercice t^{+2h} . L'ajout d'Antimycine A, inhibiteur du complexe III, fait apparaître une production de ROS significativement supérieure dans les groupes Exercice t^{0h} (+546%, $p < 0,05$) et Exercice t^{+2h} (+271%, $p < 0,05$) par rapport au groupe contrôle. La production du groupe Exercice t^{0h} est supérieure (+74%, $p < 0,05$) par rapport au groupe Exercice t^{+2h} .

En présence de succinate, la production d' H_2O_2 , est significativement inhibée à l'état 3 dans les groupes Exercice t^{0h} et Exercice t^{+2h} par rapport au groupe contrôle (Tableau 12). L'ajout de roténone révèle une production significativement supérieure dans les groupes Exercice t^{0h} (+215%, $p < 0,05$) et Exercice t^{+2h} (+129%, $p < 0,05$) par rapport au groupe contrôle. L'ajout d'Antimycine A fait apparaître une production de ROS significativement supérieure dans les groupes Exercice t^{0h} (+576%, $p < 0,05$) et Exercice t^{+2h} (+456%, $p < 0,05$) par rapport au groupe contrôle.

La stimulation globale de la chaîne en présence de G/M/S montre une production supérieure à l'état 3 dans les groupes Exercice t^{0h} (+199%, $p < 0,05$) et Exercice t^{+2h} (+132%, $p < 0,05$) par rapport au groupe contrôle (Tableau 12). L'ajout de roténone révèle une

production significativement supérieure dans les groupes Exercice t^{0h} (+179%, $p < 0,05$) et Exercice t^{+2h} (+139%, $p < 0,05$) par rapport au groupe contrôle. L'ajout d'Antimycine A fait apparaître une production de ROS significativement supérieure dans les groupes Exercice t^{0h} (+412%, $p < 0,05$) et Exercice t^{+2h} (+364%, $p < 0,05$) par rapport au groupe contrôle.

L'utilisation de PC montre une production d' H_2O_2 supérieure uniquement après adjonction de roténone et d'Antimycine A dans les groupes Exercice t^{0h} (+267%, $p < 0,05$) et Exercice t^{+2h} (+161%, $p < 0,05$) par rapport au groupe contrôle (Tableau 12). Dans cette condition, la production est supérieure dans le groupe Exercice t^{0h} par rapport au groupe Exercice t^{+2h} (+40%, $p < 0,05$).

2.2.2 Production radicalaire des mitochondries hépatiques

		Foie		
		Contrôle	Exercice t ^{0h}	Exercice t ^{+2h}
Glutamate/Malate	<i>Etat 2</i>	27,67 ± 4,39	27,98 ± 3,30	37,69 ± 5,36
	<i>Etat 3</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	<i>Roténone</i>	42,03 ± 4,81	38,92 ± 4,31	44,61 ± 4,64
	<i>AA</i>	65,96 ± 5,34	62,12 ± 6,16	71,54 ± 5,22
Succinate	<i>Etat 2</i>	125,93 ± 6,92	115,23 ± 8,71	152,40 ± 4,68 *#
	<i>Etat 3</i>	0 ± 0	0,14 ± 0,15	0 ± 0
	<i>Roténone</i>	15,60 ± 5,42	17,49 ± 3,83	13,46 ± 2,50
	<i>AA</i>	39,84 ± 4,42	41,10 ± 3,90	41,99 ± 2,65
Glutamate/Malate/ Succinate	<i>Etat 2</i>	128,16 ± 7,42	111,61 ± 8,39	145,41 ± 7,12 #
	<i>Etat 3</i>	6,83 ± 2,88	4,21 ± 1,92	5,19 ± 2,00
	<i>Roténone</i>	44,66 ± 6,65	40,92 ± 6,71	44,12 ± 2,37
	<i>AA</i>	75,07 ± 5,58	64,97 ± 5,46	75,46 ± 5,16
Palmitoyl-L-Carnitine	<i>Etat 2</i>	36,84 ± 3,90	26,84 ± 1,43 *	35,11 ± 2,57
	<i>Etat 3</i>	10,22 ± 3,69	2,81 ± 1,31	7,85 ± 3,14
	<i>Roténone</i>	32,20 ± 6,42	18,28 ± 3,05 *	26,45 ± 3,64
	<i>AA</i>	66,10 ± 6,74	53,70 ± 4,16	66,72 ± 4,27

Tableau 13 : Effet du délai post-exercice sur la production de peroxyde d'hydrogène (pmol d'H₂O₂/min/mg prot) de mitochondries de foie provenant de rats contrôles, exercés pendant 60 min et sacrifiés dès la fin de l'exercice (Exercice t^{0h}) ou exercés pendant 60 min et sacrifiés 2h après la fin de cet exercice (Exercice t^{+2h})

Les mitochondries de muscle (0,25 mg/ml) ont été incubées à 30°C dans le milieu suivant : 125mM KCl, 1 mM EGTA, 20 mM Tris, 0,15% BSA délipidée, 5mM Pi-Tris, pH 7,2 en présence de 1µM d'Amplex Red, 6U/ml d'HRP et supplémentées avec 4 conditions de substrats : soit glutamate/malate (5,5/2,5mM), soit succinate/roténone (5,5mM/2,5µM), soit glutamate/malate/succinate (5,5/2,5/5,5mM), soit palmitoyl-L-carnitine/malate (55µM/1mM). La production d'H₂O₂ à l'état 3 a été obtenue après addition de 300µM d'ADP. L'addition de 1,25µM de roténone permet d'inhiber le complexe I et l'addition de 1,5µM d'Antimycine A, le complexe III. Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM avec n=8. * Différent du groupe contrôle, # Différent du groupe Exercice t^{0h} (p < 0,05).

2.2.2.1 Effets du substrat sur la production d' H_2O_2 de mitochondries hépatiques

La production d' H_2O_2 en présence de succinate est 5 fois supérieure à celle mesurée en présence de G/M. L'addition d'ADP en présence de substrats alimentant séparément les complexes I ou II inhibe totalement les productions (Tableau 13).

2.2.2.2 Effets du délai post exercice sur la production d' H_2O_2 de mitochondries hépatiques

La production d' H_2O_2 en présence de G/M est similaire entre les groupes quelque soit l'état respiratoire ou le niveau d'inhibition (Tableau 13).

En présence de succinate, la production d' H_2O_2 à l'état 2 est significativement supérieure dans le groupe Exercice t^{+2h} par rapport au groupe contrôle (+21%, $p < 0,05$) et au groupe Exercice t^{0h} (+32%, $p < 0,05$) (Tableau 13).

La stimulation globale de la chaîne en présence de G/M/S montre une production supérieure à l'état 2 dans les groupes Exercice t^{+2h} (+30%, $p < 0,05$) par rapport au groupe Exercice t^{0h} (Tableau 13).

L'utilisation de PC révèle une production d' H_2O_2 inférieure dans le groupe Exercice t^{0h} par rapport au groupe Exercice t^{+2h} à l'état 2 (-27%, $p < 0,05$), à l'état 3 (-73%, NS), après ajout de roténone (-43%, $p < 0,05$) et d'Antimycine A (-19%, NS) (Tableau 13).

2.3 Rapport H₂O₂/JO₂

ROS / JO₂ (état 2)	Foie			Muscle		
	Contrôle	Exercice t ^{0h}	Exercice t ^{+2h}	Contrôle	Exercice t ^{0h}	Exercice t ^{+2h}
Glutamate/Malate	2,95 ± 0,37	2,80 ± 0,33	3,46 ± 0,57	2,21 ± 0,35	2,07 ± 0,15	1,50 ± 0,28
Succinate	5,77 ± 0,41	4,91 ± 0,83	6,02 ± 0,93	25,16 ± 4,03	26,73 ± 3,51	23,92 ± 2,67
Glutamate/Malate/ Succinate	5,22 ± 0,30	4,35 ± 0,79	5,80 ± 0,28	21,19 ± 3,35	20,18 ± 2,65	21,01 ± 2,47
Palmitoyl-L- Carnitine	3,23 ± 0,25	2,35 ± 0,20 *	2,78 ± 0,23	2,01 ± 0,33	2,09 ± 0,39	2,01 ± 0,28

Tableau 14 : Effet du délai post-exercice sur le rapport entre la production de peroxyde d'hydrogène (pmol d'H₂O₂/min/mg prot) et la consommation d'oxygène (nmol d'O/min/mg prot) à l'état 2 de mitochondries de foie et de muscle provenant de rats contrôles, exercés pendant 60 min et sacrifiés dès la fin de l'exercice (Exercice t^{0h}) ou sacrifiés 2h après la fin de cet exercice (Exercice t^{+2h}).

Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM avec n=8. * Différent du groupe contrôle (p < 0.05).

Dans le foie, le rapport entre la production d'H₂O₂ et la consommation d'oxygène à l'état 2 est significativement inférieur en présence de PC dans le groupe Exercice t^{0h} par rapport au groupe contrôle (-27%, p < 0,05) (Tableau 14).

La mesure de ce rapport ROS/JO₂ ne révèle aucune différence significative au niveau musculaire quelques soient les substrats respiratoires (Tableau 14).

ROS / JO₂ (état 3) 10²	Foie			Muscle		
	Contrôle	Exercice t ^{0h}	Exercice t ^{+2h}	Contrôle	Exercice t ^{0h}	Exercice t ^{+2h}
Glutamate/Malate	0	0	0	3,2 ± 0,8	9,4 ± 0,9 *	5,6 ± 1,1 #
Succinate	0	0,1 ± 0,1	0	5,5 ± 0,6	0,2 ± 0,2 *	0 *
Glutamate/Malate/ Succinate	4,2 ± 1,9	2,3 ± 1,0	2,9 ± 1,2	5,3 ± 0,8	12,4 ± 2,2 *	10,2 ± 1,5 *
Palmitoyl-L- Carnitine	13,4 ± 4,6	4,1 ± 2,2	8,6 ± 3,6	20,1 ± 3,0	11,3 ± 1,9 *	10,5 ± 1,4 *

Tableau 15 : Effet du délai post-exercice sur le rapport entre la production de peroxyde d'hydrogène (pmol d'H₂O₂/min/mg prot) et la consommation d'oxygène (nmol d'O/min/mg prot) à l'état 3 de mitochondries de foie et de muscle provenant de rats contrôles, exercés pendant 60 min et sacrifiés dès la fin de l'exercice (Exercice t^{0h}) ou sacrifiés 2h après la fin de cet exercice (Exercice t^{+2h}).

Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM avec n=8. * Différent du groupe contrôle, # Différent du groupe Exercice t^{0h} (p < 0,05).

Dans le foie, le rapport ROS/JO₂ à l'état 3 n'est pas affecté par l'exercice quelques soient les substrats (Tableau 15).

Dans le muscle, on remarque que le rapport ROS/JO₂ est supérieur en présence de G/M dans le groupe Exercice t^{0h} par rapport au groupe contrôle (+194%, p < 0,05) et au groupe Exercice t^{+2h} (+68%, p < 0,05). En présence de succinate ce rapport est inférieur dans les groupes Exercice t^{0h} (-96%, p < 0,05) et Exercice t^{+2h} (-100%, p < 0,05) par rapport au contrôle (Tableau 15).

Lorsque la chaîne est alimentée dans sa globalité avec du G/M/S, ce rapport est supérieur dans les groupes Exercice t^{0h} (+133%, p < 0,05) et Exercice t^{+2h} (+92%, p < 0,05) par rapport au contrôle. Avec du PC il est inférieur dans les groupes Exercice t^{0h} (-44%, p < 0,05) et Exercice t^{+2h} (-48%, p < 0,05) par rapport au contrôle (Tableau 15).

2.4 Défenses antioxydantes, activité cytochrome oxydase et exercice unique

	Foie			Muscle		
	Contrôle	Exercice t ^{0h}	Exercice t ^{+2h}	Contrôle	Exercice t ^{0h}	Exercice t ^{+2h}
Complexe IV (nmol/min/mg protéine)	810,85 ± 41,2	842,54 ± 55,5	862,29 ± 28,1	2741,81 ± 37,4	2597,67 ± 108,3	2491,53 ± 74,7
GSH (µmol/g tissu)	1007,94 ± 47,57	1112,22 ± 35,65	1077,56 ± 28,40	141,38 ± 10,60	141,08 ± 6,87	136,23 ± 7,94
GSSG (µmol/g tissu)	27,59 ± 1,46	34,78 ± 3,40 *	42,79 ± 2,40 *#	43,61 ± 3,38	41,16 ± 1,85	45,38 ± 3,05
GSH/GSSG	37,17 ± 2,75	33,83 ± 3,43	25,58 ± 1,35 *#	3,26 ± 0,13	3,44 ± 0,11	3,03 ± 0,11 #
Statut Antioxydant Mitochondrial Total (UA)	45,61 ± 1,37	48,68 ± 1,91	49,24 ± 1,12	42,13 ± 1,06	44,98 ± 1,45	44,35 ± 0,91

Tableau 16: Activité du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale de muscle squelettique et de foie de rats contrôles, exercés pendant 60 min et sacrifiés dès la fin de l'exercice (Exercice t^{0h}) et sacrifiés 2h après la fin de cet exercice (Exercice t^{+2h}).

Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM avec n=8.

L'activité de la cytochrome oxydase, complexe IV (dosée par spectrométrie), le statut antioxydant total (estimé par fluorimétrie) et le contenu en glutathion réduit (GSH) ne sont pas influencés par l'exercice quelque soit le tissu (Tableau 16).

Dans le foie, le contenu en glutathion oxydé est significativement supérieur au niveau hépatique dans les groupes Exercice t^{0h} (+26%, $p < 0,05$) et Exercice t^{+2h} (+55%, $p < 0,05$) par rapport au groupe contrôle (Tableau 16). Le contenu en GSSG du groupe Exercice t^{+2h} est supérieur par rapport au groupe Exercice t^{0h} (+23%, $p < 0,05$). Le rapport GSH/GSSH est significativement inférieur dans le groupe Exercice t^{+2h} par rapport au groupe contrôle (-31%, $p < 0,05$) et au groupe Exercice t^{0h} (-24%, $p < 0,05$).

Au niveau musculaire, le contenu en GSSG n'est pas affecté par l'exercice mais le rapport GSH/GSSG est significativement inférieur dans le groupe Exercice t^{+2h} par rapport au groupe Exercice t^{0h} (-12%, $p < 0,05$) (Tableau 16).

Pour le complexe IV, nous pouvons constater que le muscle possède une activité 3 fois supérieure à celle du foie (Tableau 16).

2.5 Discussion

Dans cette étude nous nous sommes intéressés aux effets d'un exercice modéré sur les adaptations mitochondriales précoces. Pour cela nous avons étudié le fonctionnement de la chaîne respiratoire (Annexe) dans des groupes de rats ayant subi un exercice unique et sacrifiés dès la fin de l'exercice (Exercice t^{0h}) ou 2 heures après la fin de celui-ci (Exercice t^{+2h}). A notre connaissance cette étude est la première à s'intéresser à la mise en parallèle de la consommation d'oxygène et de la production de ROS au décours de l'exercice en comparant un tissu consommateur (muscle) et un tissu fournisseur (foie) d'énergie (Ghanassia et coll., 2007).

Notre protocole d'exercice unique, estimé à un travail modéré équivalent à 75% de VO_2max (Brooks et White, 1978), apparaît cependant comme suffisamment intense pour induire des altérations du fonctionnement mitochondrial à court terme. Bien que la consommation d'oxygène ne soit que faiblement altérée (Tableau 10-11), nous observons des augmentations importantes de production d' H_2O_2 au niveau des mitochondries musculaires sans doute liées à un état de réduction plus important des complexes respiratoires (Tableau 12). Les modifications observées sont, de façon assez attendue, plus marquées au niveau du tissu musculaire comparativement au tissu hépatique (Tableau 12-13).

Respiration mitochondriale et exercice unique

La mesure de consommation d'oxygène révèle des adaptations mitochondriales post-exercice seulement au niveau musculaire (Tableau 10). En effet les respirations sont inchangées dans le foie suite à l'exercice (Tableau 11).

Sur un plan très mécanistique, nous avons pu étudier la chaîne respiratoire par des entrées isolées d'équivalents réduits en utilisant des concentrations saturantes de substrats glutamate/malate et succinate. Lorsqu'on utilise de tels substrats séparément, la respiration dans les mitochondries isolées est le résultat d'un effet conjugué de l'activité du cycle de Krebs, de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, de l'utilisation du potentiel de membrane, de l'activité de l'ATP synthase et de l'activité du transporteur des nucléotides adényliques (ANT : adenine nucleotide translocase) (Mogensen et coll., 2007).

Que ce soit dans la condition G/M qui alimente la chaîne en NADH pour le complexe I ou succinate qui transfère du FADH₂ au complexe II, nous n'observons aucune modification fonctionnelle de la chaîne respiratoire mitochondriale de muscle. Cependant, lorsque de façon originale comparativement aux études de la littérature, la respiration est mesurée dans des conditions plus proches de la physiologie, avec le fonctionnement global de la chaîne (G/M/S), nous observons que la respiration à l'état 2 est supérieure dans le groupe Exercice t^{0h} par rapport au groupe contrôle. La respiration à l'état 2 est contrôlée principalement par les pertes d'énergie (*proton leak*, *slipping* et activités ATPasiques) et dans une moindre mesure par la chaîne respiratoire et les transporteurs de substrats transmembranaires (Brand, 1990, Pietrobon et coll., 1983). La stimulation de la vitesse de respiration à l'état 2 peut donc être imputée au moins à deux phénomènes : (1) une activité ATPasique importante et (2) une modification des propriétés intrinsèques des mitochondries. Après addition d'oligomycine, la vitesse de respiration des rats exercés et contrôles est similaire. Or l'oligomycine inhibe les activités ATPasiques provoquées par l'exercice. Ceci suggère que les différences à l'état 2 observées dans notre étude en présence de G/M/S seraient majoritairement liées à une augmentation d'activité ATPasique suite à l'exercice. La mesure en état phosphorylant, en présence d'ADP, conforte cette hypothèse, en faisant apparaître une respiration significativement supérieure dans le groupe Exercice t^{0h} (+31%) par rapport au groupe contrôle persistant dans le temps (Exercice t^{+2h} vs contrôle, +22% NS) (Tableau 10). Chez l'homme des tendances similaires ne passant pas sous les seuils de significativité statistique sont observées avec des mesures réalisées en fin d'exercice et 3h après (Fernstrom et coll., 2004).

L'utilisation de palmitoyl-L-carnitine, substrat lipidique peu utilisé dans les études sur le fonctionnement mitochondrial, permet elle aussi d'alimenter la chaîne respiratoire dans sa globalité. Les acides gras en concentrations élevées ont des propriétés découplantes au niveau mitochondrial (Korshunov et coll., 1998). Nous avons contourné ce problème apparent en utilisant des concentrations physiologiques d'acides gras. Cela nous a permis de comparer une activation globale de la chaîne soit dans des conditions forcées (G/M/S) soit dans des conditions de doses physiologiques (PC).

Avec les acides gras nous observons que la respiration est statistiquement supérieure, à l'état activé ou phosphorylant, dans les deux groupes Exercices par rapport au groupe contrôle (Tableau 10). Ceci révèle une capacité de la mitochondrie à répondre rapidement au cours de la récupération à une stimulation de la demande énergétique en augmentant son activité respiratoire pour phosphoryler l'ADP.

Ces premiers résultats font apparaître des données novatrices dans l'étude du fonctionnement mitochondrial suite à l'exercice. Nous pouvons observer une absence de différence dans des conditions très éloignées de l'alimentation physiologique de la chaîne, en saturant une ou l'autre des entrées d'équivalents réduits. Situations méthodologiques que l'on retrouve dans de nombreuses études (Molnar et coll., 2006, Servais et coll., 2003, Venditti et coll., 2007, Venditti et coll., 1999). Cependant nous avons réussi à relever des adaptations dans des situations de stimulations globales de la chaîne respiratoire. Que ce soit dans des conditions de substrats en concentrations saturantes ou physiologiques. Cela confirme l'importance des interactions inter-complexes dans la chaîne respiratoire et de la canalisation des électrons extrait de l'oxydation des équivalents réduits au niveau des complexes I et II.

Production de ROS et exercice unique

Il est reconnu que le taux de production de ROS est fonction du degré de réduction des complexes de la chaîne respiratoire (Boveris et Chance, 1973). En bloquant la chaîne respiratoire avec un inhibiteur spécifique, on observe une augmentation de l'état de réduction des complexes en amont du site d'inhibition et du côté de l'entrée du substrat dans la chaîne respiratoire. Ainsi les complexes en aval, du côté distal de la chaîne, deviennent plus oxydés. De ce fait, en présence d'inhibiteur, le site lié à une augmentation de la production de ROS, par gain d'électrons, est localisé entre l'entrée du substrat et le site d'inhibition. Inversement, si la production de ROS diminue après l'ajout d'inhibiteur, c'est que dans cette condition le site majeur de production est en aval (Annexe-chaîne respiratoire).

L'effet de l'exercice unique sur la production mitochondriale de ROS diffère de façon importante selon le tissu étudié. La production de ROS qui est augmentée dans le muscle dans la majorité des conditions dans le groupe Exercice t^{0h} par rapport au groupe contrôle (Tableau 12) est inchangée ou diminuée dans les mitochondries de foie (Tableau 13). De plus, nous avons pu observer des effets au décours de l'exercice spécifique à un état de réduction particulier du tissu hépatique. Ces résultats confirment que la production de ROS est étroitement dépendante du tissu considéré (Barja, 1999, St-Pierre et coll., 2002).

Il existe cependant des mécanismes de production redondants dans les deux tissus. La production à l'état basal (état 2) est toujours supérieure à celle obtenue en état phosphorylant (état 3) qui peut être nulle dans certaines conditions de substrats (Barja, 2002, Boveris et Chance, 1973). Les productions maximales de ROS se font au niveau du complexe I via le flux inverse d'électrons. Ceci est mis en évidence par les productions d'H₂O₂ importante en présence de succinate ou de G/M/S qui sont inhibées par l'ajout d'inhibiteur du complexe I (roténone) (Barja, 2002, St-Pierre et coll., 2002). Cet effet, flux inverse, obtenu en succinate et G/M/S par rapport à la situation G/M est nettement supérieur dans le muscle (x30) (Tableau 12) comparativement au foie (x5) (Tableau 13). Une explication assez simple de ces résultats résiderait dans le fait que les mitochondries hépatiques possèdent un contenu inférieur en composants de la chaîne respiratoire comparativement au muscle. De façon spécifique, les mitochondries de foie ont approximativement une activité 10 fois moins importante pour le complexe I et 6 fois plus faible pour le complexe III par rapport aux mitochondries musculaires (Kwong et Sohal, 2000). Cela pourrait provenir aussi d'une différence d'architecture supramoléculaire des complexes induisant une canalisation des électrons différente entre les deux populations de mitochondries (Boekema et Braun, 2007).

La mesure de la production de ROS fait ressortir un effet important de l'exercice sur l'état de réduction des composants de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'adjonction d'ADP qui inhibe fortement la production de ROS dans le groupe contrôle, voit son effet significativement diminué dans les groupes Exercices (Tableau 12-13; G/M, G/M/S).

L'utilisation des différents substrats nous montre que l'exercice favoriserait particulièrement l'état de réduction du complexe III de la chaîne respiratoire des mitochondries de muscle (Tableau 12). En présence de succinate seul ou de G/M/S stimulant principalement la production au niveau du complexe I par le flux inverse, nous n'observons aucune modification de production liée à l'exercice. Cependant, quelque soit le substrat, la mesure de production en présence d'AA, inhibiteur du complexe III, fait elle ressortir une production supérieure dans les deux groupes Exercices (Tableau 12, AA). Le complexe III,

située au carrefour du transfert intramembranaire d'électrons provenant des complexes I et II ou de l'ETF par l'intermédiaire des quinones, semble donc être dans un état de réduction plus important dans les deux groupes Exercices et cela de façon persistante au cours de la récupération.

La production de ROS mitochondriale est dépendante du potentiel électrique de membrane ($\Delta\Psi$) (Korshunov et coll., 1997). Un potentiel de membrane élevé semble favoriser la production de ROS et cela préférentiellement au niveau du complexe III. Ceci serait dû à un transport d'électron ralenti et à un prolongement de la forme réduite de l'ubisemiquinone QH⁻ au niveau du complexe III (Zhang et Gutterman, 2007).

Inversement, il a été montré que les découplants de l'oxydation phosphorylante (ex : DNP) ou les protéines découplantes (UCP) font chuter le potentiel de membrane et diminuent ainsi la production de ROS. De façon intéressante, il existerait un rétrocontrôle des espèces activées de l'oxygène sur les découplants membranaires. Il a été montré que l'O₂⁻ active les protéines découplantes UCP par l'intermédiaire des produits de la peroxydation lipidique. (Talbot et coll., 2004). Ce mécanisme permettrait de contrôler les augmentations soudaines de production radicalaire.

La production d'H₂O₂ au niveau musculaire révèle des résultats similaires dans toutes les successions substrats/inhibiteurs sauf lorsque la chaîne est alimentée avec du palmitoyl-L-carnitine. La production basale de ROS est que faiblement diminuée par l'ADP alors qu'elle est inhibée avec les autres substrats et ne révèle pas de différence entre les groupes. L'ajout de roténone n'amplifie pas la production post-exercice. Ces différentes constatations laissent penser à un trajet ou un niveau d'énergie bien spécifique des électrons en provenance des acides gras.

La fourniture globale de la chaîne respiratoire avec des équivalents réduits NADH et FADH₂ issus de substrats lipidiques (palmitoyl-L-carnitine, acides gras à chaîne longue) induit une production de ROS qui diffère de celle obtenue en présence de G/M/S. Elle est à la fois plus faible et peu modifiée par l'ajout de roténone, mettant ainsi en évidence que le principal site de production de ROS pendant la β -oxydation ne semble pas être le complexe I. Cette différence de profil entre acides gras et G/M/S peut venir de la différence de proportion des équivalents réduits fournis par ces différents substrats ; le rapport NADH/FADH₂ étant de 4 lors du catabolisme des hydrates de carbones (G/M/S) alors qu'il n'est que de 2 pour les acides gras.

La production d'H₂O₂ obtenue avec le palmitoyl-L-carnitine est similaire à celle mesurée en présence de substrat du complexe I. Cela semble être dû au fait que le palmitoyl-L-carnitine ne provoque pas une réduction importante du complexe I par un flux inverse d'électrons comme on peut l'observer dans la condition G/M/S. Ce fait peut être expliqué par un mécanisme de compétition avec l'ETF-QO (Electron Transfer Flavoprotein quinone oxidoreductase) pour oxyder la quinone. L'ETF reçoit des électrons provenant de 8 déshydrogénases primaires de la matrice mitochondriale incluant celle de la β -oxydation. L'ETF est rapidement réduit sous sa forme semiquinone ETF²⁻ et plus tardivement sous sa forme totalement réduite, suggérant que l'ETF²⁻ est le donneur principal d'électrons pour l'ETF-QO lors de l'oxydation des acides gras (Ramsay et coll., 1987). Cette canalisation particulière des électrons en provenance des acides gras semble pouvoir expliquer les différences obtenues lors d'une stimulation globale de la chaîne avec du palmitoyl-L-carnitine comparativement à la situation G/M/S.

La mesure de production d'H₂O₂ au niveau hépatique montre un effet de l'exercice tissu spécifique. La production de ROS par le flux inverse (Tableau 13; Succinate, G/M/S basal) est supérieure dans le groupe Exercice t^{+2h} par rapport au groupe contrôle et Exercice t^{0h}. Ceci fait ressortir un effet retardé sur l'état de réduction du complexe I des mitochondries de foie. Cette modification est spécifique du complexe I car les mesures en présence d'AA ne révèlent aucune modification de l'état de réduction du complexe III entre les groupes.

Au niveau hépatique, l'utilisation des acides gras révèlent aussi des adaptations particulières. On observe une diminution transitoire de la production de radicaux libres dans le groupe Exercice t^{0h} par rapport au groupe contrôle (-20 à -40%) (Tableau 13).

Il est difficile pour nous de comparer les effets de notre protocole d'exercice utilisé avec les données observées dans la littérature concernant les adaptations mitochondriales. Cela est dû à un grand nombre de différences expérimentales liées en partie aux conditions d'exercice mais principalement aux sondes fluorescentes utilisées. En effet, si on considère les travaux qui ont étudié la production d'H₂O₂ dans différentes conditions de substrats (Molnar et coll., 2006, Servais et coll., 2003, St-Pierre et coll., 2002, Venditti et coll., 2007, Venditti et coll., 1999), ceux-ci révèlent des mécanismes d'adaptation probablement liés à la sensibilité propre de leurs sondes (HVA). Dans une publication sur les mécanismes de production radicalaire par les différents complexes, St-Pierre et coll. ne révèlent aucune production de ROS sur mitochondries hépatiques en présence de palmitoyl-L-carnitine ou en

présence de succinate + roténone. Les auteurs spécifient que dans la plupart des cas les productions sont trop faibles pour pouvoir être détectées. Dans des travaux récents sur l'exercice, Molnar et coll. font apparaître des modifications de la production d' H_2O_2 en présence de pyruvate/malate, substrats du complexe I, alors que Servais et coll. montrent des problèmes d'interférence de la sonde avec le substrat. Dans nos conditions expérimentales, en présence d'Amplex Red, nous observons des différences significatives sur des faibles productions radicalaires, qui relèvent d'une plus grande sensibilité de la sonde Amplex Red. De plus, aucune interférence avec les différents substrats utilisés n'a été relevée à ce jour. Ceci implique de façon évidente l'apparition d'autres mécanismes d'adaptations.

Contrairement à de nombreuses études qui affirment que la production de ROS mitochondriale est en lien direct avec la consommation d'oxygène, nous observons dans notre étude des variations de production d' H_2O_2 sans modification importante de la consommation d' O_2 . Il semble donc que nous révélions, dans nos conditions de mesures, des mécanismes d'adaptations spécifiques à la production de ROS par les complexes de la chaîne respiratoire.

Défenses antioxydantes et exercice unique

Les paramètres antioxydants que nous avons mesurés ne sont que très peu influencés par l'exercice ou ne révèlent pas de perturbations importantes des tissus étudiés (Tableau 16). Il semble donc que la production de radicaux libres que nous avons pu mettre en avant soit contrôlée par des défenses en excès.

L'activité de la cytochrome oxydase, évaluée par spectrométrie ou oxygraphie n'est pas différente entre les groupes. Certains auteurs associent l'augmentation de la production de ROS lors de pathologies (Alzheimer, Encephalomyopathie) à la diminution de l'activité de la COX (Cardoso et coll., 2004, Di Giovanni et coll., 2001). La cytochrome c oxydase est de ce fait définie comme un système majeur de défense antioxydante, notamment par sa capacité à diminuer la stœchiométrie H^+/e (Papa et coll., 1997). De façon similaire, il a été montré que l'activité de la cytochrome oxydase était inchangée sur mitochondrie de foie entre des animaux soumis à un exercice de 3 heures de natation comparativement à un groupe contrôle (Radeva-Domustchieva et Russanov, 1976).

La mesure du contenu en glutathion réduit (GSH) représentant plus de 95% du contenu en glutathion total (GSH-GSSG) est inchangée dans les différents groupes. Le

glutathion oxydé (GSSG) est lui augmenté au niveau hépatique mais inchangé au niveau musculaire. Ces observations permettent d'appuyer le rôle antioxydant du foie avec un contenu en glutathion supérieur de presque 10 fois par rapport au muscle qui peut être utilisé pour contrôler la production de ROS sans la supprimer totalement.

Les radicaux libres, comme l'anion superoxyde et son dérivé le peroxyde d'hydrogène ont longtemps été considérés comme des déchets, produits par la chaîne respiratoire, à la source de dommages oxydants importants dans leur environnement proche (ADNmt, protéines, lipides). Les résultats obtenus dans cette première partie montrent une augmentation de la production de ROS suite à un exercice qui n'engendre pas de perturbations majeures des défenses antioxydantes. Cette production résiduelle contrôlée par les mécanismes de défense pourrait être un signal cellulaire à la source des adaptations mitochondriales induites par l'exercice chronique.

3 Modifications de l'activité mitochondriale induites par l'activité physique chronique

Cette deuxième partie a eu pour objectif d'évaluer les effets d'un entraînement en endurance modéré sur la production de ROS et sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Pour cela nous avons comparé deux groupes de rats : un groupe contrôle et un groupe entraîné 6 semaines sur tapis roulant à une intensité évaluée à 75% VO_{2max} . Dans les mêmes conditions que pour la première partie, nous avons étudié le fonctionnement mitochondrial musculaire et hépatique à partir de différents substrats d'intérêts. Notre revue de littérature actuelle ne fait apparaître aucune étude faisant ressortir en parallèle l'influence d'une activité chronique sur l'adaptation fonctionnelle de la chaîne respiratoire mitochondriale de muscle et de foie.

Le muscle qui subit une biogenèse mitochondriale à la suite de l'entraînement en endurance révèle aussi des adaptations au niveau de la chaîne respiratoire. De façon étonnante il apparaît dans cette étude que le foie répond lui aussi à l'entraînement par une augmentation de densité mitochondriale et des adaptations fonctionnelles de la chaîne respiratoire.

3.1 Résultats préliminaires : validation du protocole d'entraînement

Cette première phase expérimentale a eu pour but de contrôler l'évolution pondérale et alimentaire des rats au cours du protocole d'entraînement de 6 semaines. L'activité physique chronique est reconnue pour limiter la prise de poids. Par ce contrôle préliminaire nous avons souhaité nous affranchir d'une éventuelle restriction alimentaire du groupe entraîné pouvant être source de biais expérimentaux. Dans un second temps, la mesure de l'activité citrate synthase, enzyme du cycle de Krebs, considérée dans la littérature comme un indice robuste d'adaptation à l'entraînement, nous a permis de valider l'efficacité de notre protocole d'entraînement de 6 semaines.

3.1.1 Evolution pondérale

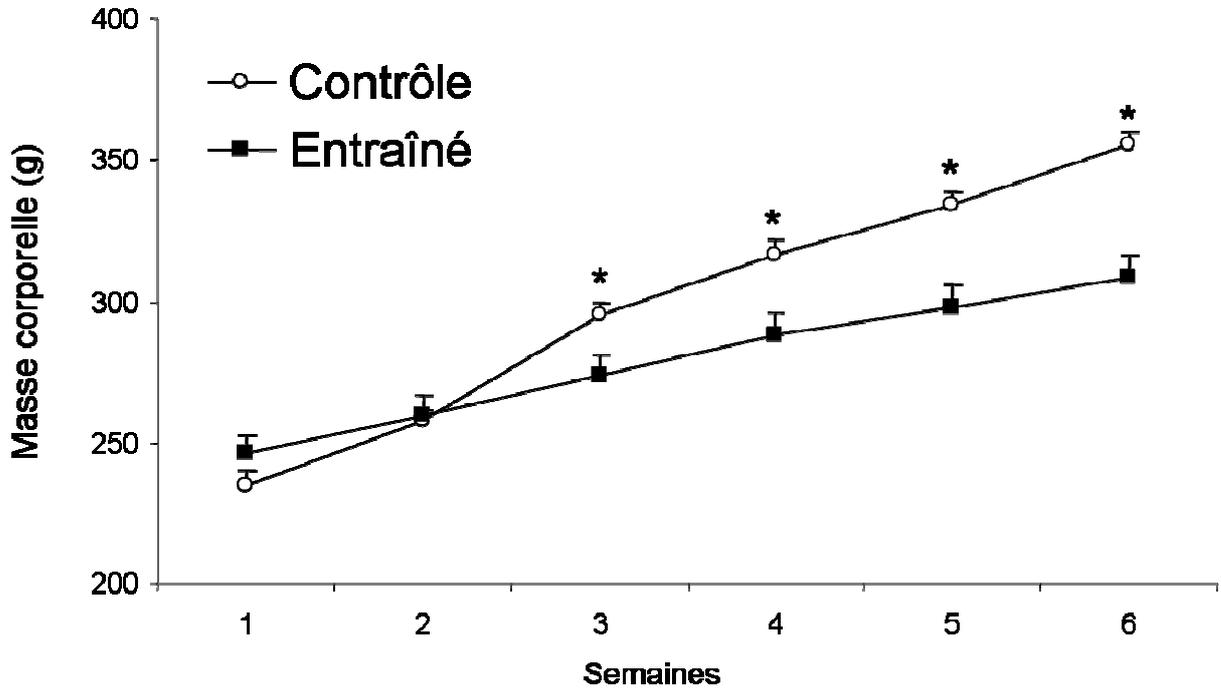


Figure 47 : Effet de l'entraînement en endurance sur l'évolution de la masse corporelle (g) de rats.

La masse corporelle est enregistrée 2 fois par semaine et moyennée chaque semaine depuis le premier jour de l'étude et jusqu'au jour de sacrifice des animaux. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM avec $n=8$. * Différent du groupe entraîné ($p < 0,05$).

La masse corporelle mesurée sur les 6 semaines d'entraînement est significativement inférieure pour les rats entraînés à partir de la 3^{ème} semaine (+8 à 15% ; $p < 0.05$) par rapport au groupe contrôle (Figure 47).

3.1.2 Evolution de la prise alimentaire

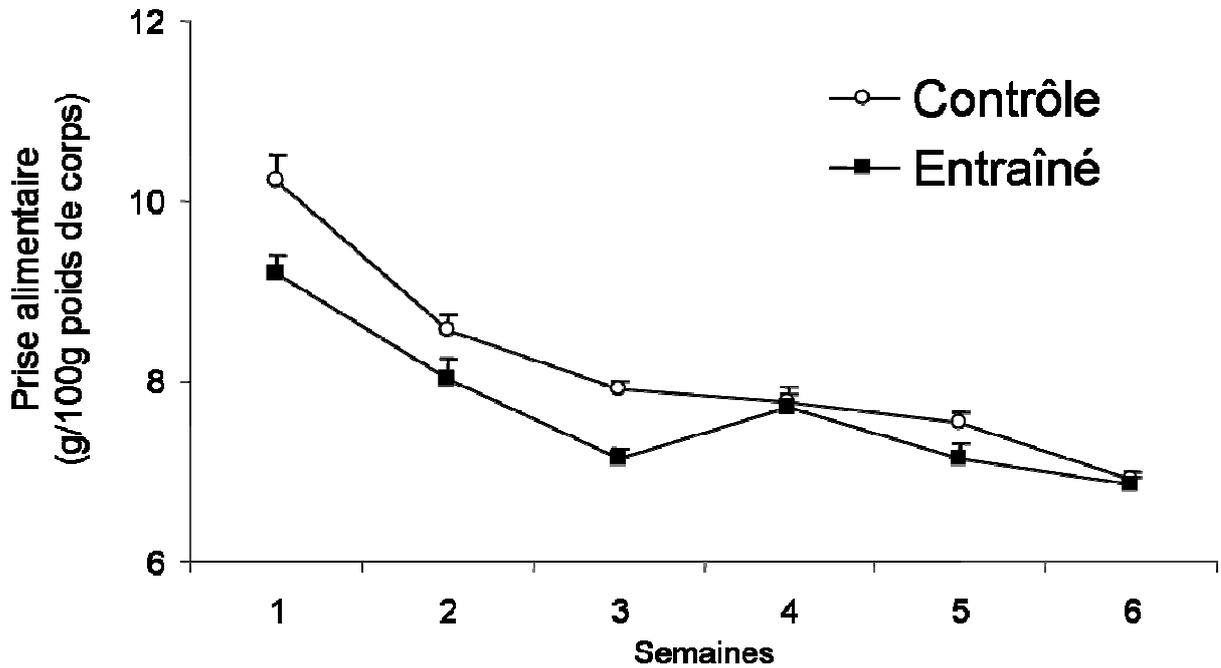


Figure 48 : Effet de l'entraînement en endurance sur la prise alimentaire (g/100g de poids de corps) de rats.

La prise alimentaire des rats placés en cages individuelles est enregistrée 2 fois par semaine et moyennée chaque semaine depuis le premier jour de l'étude et jusqu'au jour de sacrifice des animaux. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM avec $n=8$. * Différent du groupe entraîné ($p < 0,05$).

La prise alimentaire, mesurée sur 6 semaines, n'est pas significativement différente entre les groupes entraîné et contrôle (Figure 48).

3.1.3 Evolution de l'activité citrate synthase

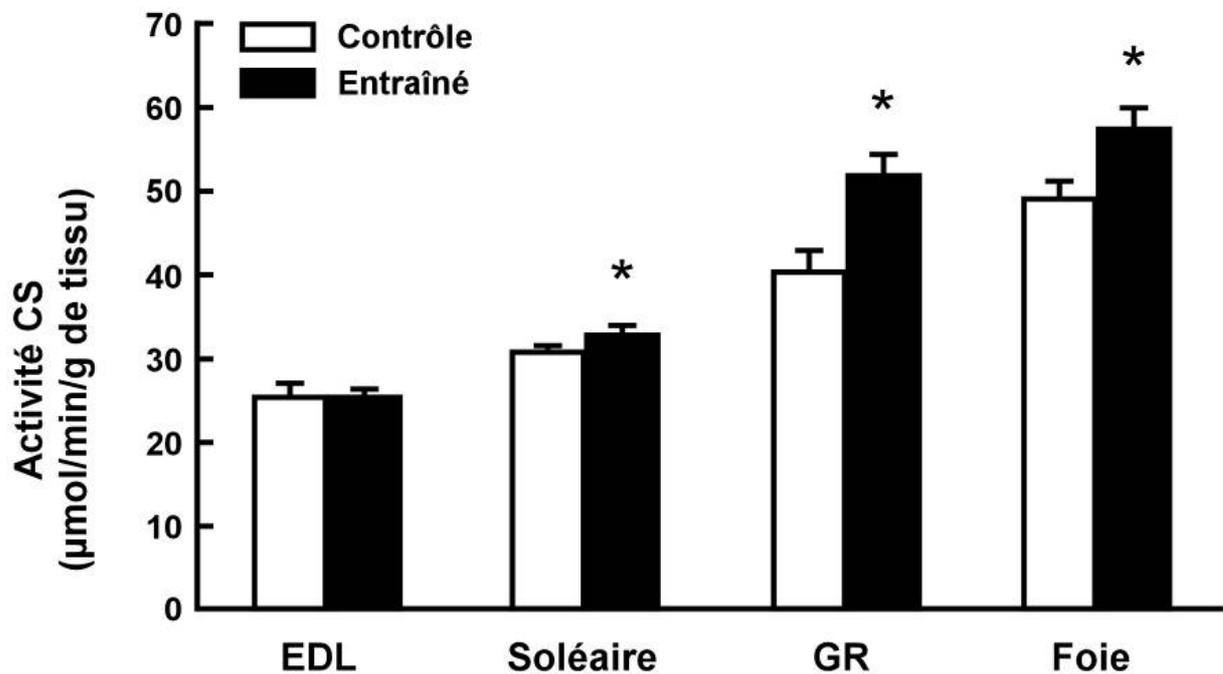


Figure 49 : Effet d'un entraînement en endurance sur l'activité de la citrate synthase (CS) de tissus musculaires et hépatique.

EDL : Extenseur des doigts longs, GR : Gastrocnémien rouge.

Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM avec $n=8$. * Différent du groupe entraîné ($p < 0,05$).

Le protocole d'entraînement en endurance de 6 semaines utilisé dans ces travaux est associé à des différences d'activité de la citrate synthase (CS) par quantité de tissu (Figure 49). En effet, l'activité de la CS est supérieure dans le soléaire (+ 7 %, $p < 0,05$) des rats entraînés par rapport aux contrôles ($32,9 \pm 1,0$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de tissu vs $30,9 \pm 0,5$ respectivement). La même évolution est observée dans le muscle GR avec une augmentation de 28 % ($p < 0,05$) chez les rats entraînés par rapport aux contrôles ($52,0 \pm 2,4$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de tissu vs $40,6 \pm 2,4$, respectivement). L'activité de la citrate synthase reste par contre inchangée dans le muscle EDL (Figure 49).

Les rats entraînés en endurance présentent également une activité de CS par quantité de tissu supérieure (+ 17%, $p < 0,05$) dans le foie par rapport aux rats contrôles ($57,5 \pm 2,5$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de tissu vs $49,2 \pm 2,0$, respectivement) (Figure 49).

3.1.4 Discussion intermédiaire

L'impact de l'entraînement en endurance a été évalué par la mesure de différents index spécifiques du métabolisme mis en jeu dans ce type d'exercice. Wisloff et coll (2001) décrivent un ensemble de conditions de temps, de vitesse de course et d'inclinaison du tapis pour un entraînement optimal. Ainsi, dès 4 semaines d'entraînement chez le rat, ils observent une diminution de fréquence cardiaque de repos et une augmentation de la masse du ventricule droit et du ventricule gauche. De plus, il fait apparaître que $\dot{V}O_{2max}$ augmente (+30%) puis plafonne à partir de la 5^{ème} semaine d'entraînement. A partir de ces données, nous avons mis en place un protocole de 6 semaines à des intensités de travail correspondant à un travail d'endurance (Radak et coll., 2004, Venditti et coll., 1999, Wisloff et coll., 2001).

Pour évaluer son efficacité, nous avons mesuré les activités de citrate synthase dans le foie et dans les muscles EDL, soléaire et gastrocnémien rouge. Dans nos conditions, nous n'observons pas de modification de l'activité de citrate synthase (CS) au niveau du muscle extenseur long des doigts (EDL). Les valeurs contrôles obtenues sont comparables à celles de la littérature (Delp et Duan, 1996). Ce résultat peut être dû au fait que ce muscle, majoritairement constitué de fibres de type II-B (Delp et Duan, 1996), est un muscle essentiellement impliqué dans les mécanismes de défense et donc relativement peu sollicité lors de la course. L'activité CS mesurée au niveau d'un muscle à fort « potentiel oxydant » comme le soléaire est supérieure chez les rats entraînés. Cette augmentation est toutefois limitée (+ 7 %) et peut là aussi s'expliquer par le fait que ce muscle essentiellement postural est peu sollicité par la course. L'activité de la CS du muscle gastrocnémien rouge (GR), muscle oxydatif (fibres de type I), fortement impliqué dans la course chez le rat, est supérieure de 28% chez les rats entraînés, confirmant l'efficacité du protocole d'entraînement en endurance utilisé.

Contre toute attente et de façon originale nous avons pu relever un effet de l'entraînement également sur la capacité oxydative au niveau du foie avec une augmentation de 17% de l'activité CS chez les entraînés par rapport aux contrôles. Les valeurs mesurées dans le groupe contrôle sont en accord avec la littérature (Dumas et coll., 2004). Ceci suggère une sensibilité du foie à l'entraînement.

La courbe de croissance des rats entraînés est ralentie mais n'est pas stoppée par l'activité chronique modérée. Ce poids corporel inférieur pourrait être lié à une perte de masse grasse (Narath et coll., 2001) expliquée par une réduction de la prise alimentaire (Ebal et coll., 2007). On remarque que ce ralentissement de la croissance n'est pas dû à une prise

alimentaire inférieure exprimée par unité de poids corporel. Il semblerait donc que le ralentissement de la prise pondérale soit lié à une dépense énergétique augmentée.

Traditionnellement, il est reconnu que la restriction calorique diminue le stress oxydant (Yu, 1996). Il a donc été primordial pour les études ultérieures de s'affranchir de ce critère. Les résultats obtenus sur les effets de la restriction restent cependant fortement influencés par la période de restriction. L'effet d'une courte période de restriction calorique (2 semaines à 4 mois) sur la production mitochondriale d' H_2O_2 reste controversé en reportant dans certains cas une diminution de la production et dans d'autres cas aucun changement. (Garait, 2006).

Cette partie de résultats préliminaires, nous a permis de valider l'efficacité de notre protocole d'endurance modéré en accord avec les critères de la littérature (Holloszy et Coyle, 1984). De plus, elle nous a permis de vérifier que le ralentissement de l'évolution pondérale des rats entraînés n'était pas corrélé à une restriction alimentaire source d'un biais expérimental. Toutefois, si les rats entraînés étaient en restriction calorique partielle, celle-ci ne semble pas susceptible d'influencer significativement nos mesures de production radicalaire.

3.2 Consommation d'oxygène et activité physique chronique

3.2.1 Consommation d'oxygène des mitochondries musculaires

		Muscle	
		Contrôle	Entraîné
Glutamate/Malate	<i>Etat 2</i>	31,29 ± 2,86	30,40 ± 3,36
	<i>Etat 3</i>	510,29 ± 28,69	438,00 ± 34,12
	<i>Etat 4</i>	24,57 ± 0,70	22,80 ± 2,54
	<i>DNP</i>	482,14 ± 30,48	423,88 ± 52,62
	<i>RCR</i>	20,79 ± 1,11	20,49 ± 2,22
Succinate	<i>Etat 2</i>	108,29 ± 9,19	106,30 ± 8,38
	<i>Etat 3</i>	456,57 ± 30,32	420,40 ± 31,31
	<i>Etat 4</i>	95,71 ± 6,00	90,80 ± 6,76
	<i>DNP</i>	400,29 ± 29,54	380,88 ± 20,37
	<i>RCR</i>	4,78 ± 0,20	4,65 ± 0,15
Glutamate/Malate/ Succinate	<i>Etat 2</i>	116,00 ± 3,83	112,10 ± 7,70
	<i>Etat 3</i>	710,14 ± 49,11	634,00 ± 47,78
	<i>Etat 4</i>	92,14 ± 5,95	97,60 ± 7,17
	<i>DNP</i>	642,43 ± 41,64	562,88 ± 23,24 *
	<i>RCR</i>	7,74 ± 0,35	6,53 ± 0,22 *
Palmitoyl-L-Carnitine	<i>Etat 2</i>	62,00 ± 10,08	41,33 ± 3,38 *
	<i>Etat 3</i>	272,00 ± 20,23	274,89 ± 20,02
	<i>Etat 4</i>	33,33 ± 2,33	30,44 ± 2,48
	<i>DNP</i>	227,83 ± 28,27	291,57 ± 27,35 *
	<i>RCR</i>	8,35 ± 0,89	9,14 ± 0,49
TMPD/Asc + DNP		1488,5 ± 165,33	1255,78 ± 94,21

Tableau 17 : Effet d'un entraînement en endurance sur la consommation d'oxygène (nmol d'O/min/mg prot), le contrôle respiratoire (RCR) et l'activité de la cytochrome oxydase (TMPD/Asc+DNP) de mitochondries de muscle provenant de rats contrôles ou entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min.

Les mitochondries de muscle (0,2 mg/ml) ont été incubées à 30°C dans le milieu suivant : 125mM KCl, 1 mM EGTA, 20 mM Tris, 0,15% BSA délipidée, 5mM Pi-Tris, pH 7,2 et supplémentée avec 4 sortes de conditions respiratoires : soit glutamate/malate (5,5/2,5mM), soit succinate/roténone (5,5mM/2,5µM), soit glutamate/malate/succinate (5,5/2,5/5,5mM), soit palmitoyl-L-carnitine/malate (55µM/1mM). La respiration à l'état 3 a été obtenue après addition de 300µM d'ADP, la respiration à l'état 4, après addition de 1,25µg/ml d'oligomycine et la respiration découplée après addition de 75µM de DNP. Le RCR (Respiratory Control Ratio) est obtenu par le rapport de l'état3 sur l'état 4. L'activité de la cytochrome oxydase est évalué par l'addition de TMPD/Ascorbate (0,5/2,5mM), Antimycine A (1,5µM) et DNP (75µM). Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM avec n=10. * Différent du groupe contrôle (p < 0,05).

Effets de l'entraînement sur la consommation d'oxygène de mitochondries musculaires

Lorsqu'on alimente séparément les complexes avec du G/M ou du succinate, les respirations mitochondriales musculaires sont inchangées dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle et cela quelque soit l'état respiratoire (Tableau 17).

La respiration mesurée avec un fonctionnement global de la chaîne (G/M/S) n'est significativement inférieure (-12%, $p < 0,05$) dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle qu'en condition découplée (DNP). En présence de G/M/S, le contrôle respiratoire est inférieur dans le groupe entraîné (-16%, $p < 0,05$) par rapport au groupe contrôle (Tableau 17).

En présence d'acides gras, la respiration à l'état 2 est inférieure (-33%, $p < 0,05$) dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle. La respiration découplée est elle significativement supérieure (+28%, $p < 0,05$) dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle (Tableau 17).

L'activité de la cytochrome oxydase déterminé par oxygraphie (TMPD/Asc+DNP) n'est pas différente entre les groupes (Tableau 17).

3.2.2 Consommation d'oxygène des mitochondries hépatiques

		Foie	
		Contrôle	Entraîné
Glutamate/Malate	<i>Etat 2</i>	11,49 ± 0,57	10,54 ± 1,09
	<i>Etat 3</i>	143,26 ± 5,90	110,78 ± 8,29 *
	<i>Etat 4</i>	8,47 ± 0,46	7,38 ± 0,71
	<i>DNP</i>	74,06 ± 7,95	89,55 ± 6,31 *
	<i>RCR</i>	16,98 ± 1,26	15,60 ± 1,15
Succinate	<i>Etat 2</i>	28,74 ± 2,32	26,02 ± 2,21
	<i>Etat 3</i>	192,11 ± 12,00	163,56 ± 12,59
	<i>Etat 4</i>	20,80 ± 1,43	18,60 ± 2,01
	<i>DNP</i>	162,46 ± 12,81	140,10 ± 6,38
	<i>RCR</i>	9,69 ± 0,77	9,26 ± 0,74
Glut/Mal/Succinate	<i>Etat 2</i>	32,40 ± 2,31	30,72 ± 2,46
	<i>Etat 3</i>	216,91 ± 14,22	172,96 ± 13,08 *
	<i>Etat 4</i>	26,06 ± 1,18	21,84 ± 1,55
	<i>DNP</i>	177,49 ± 13,61	158,30 ± 12,28
	<i>RCR</i>	8,29 ± 0,21	7,93 ± 0,24
Palmitoyl-L-Carnitine	<i>Etat 2</i>	16,51 ± 1,41	13,42 ± 1,04
	<i>Etat 3</i>	98,46 ± 6,03	75,36 ± 6,65 *
	<i>Etat 4</i>	12,11 ± 0,85	11,32 ± 0,78
	<i>DNP</i>	80,69 ± 10,58	68,90 ± 8,54
	<i>RCR</i>	8,20 ± 0,41	6,67 ± 0,46
TMPD/Asc + DNP		353,71 ± 31,71	281,68 ± 23,80

Tableau 18 : Effet d'un entraînement en endurance sur la consommation d'oxygène (nmol d'O/min/mg prot), le contrôle respiratoire (RCR) et l'activité de la cytochrome oxydase (TMPD/Asc+DNP) de mitochondries de foie provenant de rats contrôles ou entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min.

Les mitochondries de foie (0,5 mg/ml) ont été incubées à 30°C dans le milieu suivant : 125mM KCl, 1 mM EGTA, 20 mM Tris, 0,15% BSA délipidée, 5mM Pi-Tris, pH 7,2 et supplémentée avec 4 sortes de conditions respiratoires : soit glutamate/malate (5,5/2,5mM), soit succinate/roténone (5,5mM/2,5µM), soit glutamate/malate/succinate (5,5/2,5/5,5mM), soit palmitoyl-L-carnitine/malate (55µM/1mM). La respiration à l'état 3 a été obtenue après addition de 300µM d'ADP, la respiration à l'état 4, après addition de 1,25µg/ml d'oligomycine et la respiration découplée après addition de 75µM de DNP. Le RCR (Respiratory Control Ratio) est obtenu par le rapport de l'état3 sur l'état 4. L'activité de la cytochrome oxydase est évalué par l'addition de TMPD/Ascorbate (0,5/2,5mM), Antimycine A (1,5µM) et DNP (75µM). Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM avec n=10. * Différent du groupe contrôle (p < 0,05).

Effets de l'entraînement sur la consommation d'oxygène de mitochondries hépatiques

La consommation d'oxygène au niveau hépatique n'est pas différente entre les 2 groupes à l'état 2, quel que soient les substrats respiratoires (Tableau 18).

La respiration mesurée en présence de G/M est significativement inférieure à l'état 3 (-23%, $p < 0,05$) et supérieure en condition découplée (+20%, $p < 0,05$) dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle (Tableau 18)

Lorsqu'on alimente la chaîne dans sa globalité, la respiration n'est significativement inférieure qu'à l'état 3, de 20% ($p < 0,05$) en présence de G/M/S et 23% ($p < 0,05$) en présence de PC dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle (Tableau 18).

L'activité de la cytochrome oxydase déterminée par oxygraphie (TMPD/Asc+DNP) n'est pas différente entre les groupes (Tableau 18).

3.3 Production radicalaire et activité physique chronique

3.3.1 Production radicalaire des mitochondries musculaires

		Muscle	
		Contrôle	Entraîné
Glutamate/Malate	<i>Etat 2</i>	59,31 ± 9,42	72,26 ± 3,56
	<i>Roténone</i>	78,53 ± 8,97	102,79 ± 21,41
	<i>AA</i>	317,36 ± 54,14	391,28 ± 39,77
Succinate	<i>Etat 2</i>	1781,47 ± 231,76	2197,29 ± 239,07
	<i>Roténone</i>	95,65 ± 12,99	108,53 ± 21,48
	<i>AA</i>	335,63 ± 40,10	590,64 ± 49,59 *
Glut/Mal/Succinate	<i>Etat 2</i>	1425,68 ± 122,95	1938,68 ± 225,56
	<i>Roténone</i>	200,28 ± 26,04	275,65 ± 31,31 *
	<i>AA</i>	457,67 ± 51,43	814,79 ± 61,67 *
Palmitoyl-L-Carnitine	<i>Etat 2</i>	61,04 ± 8,92	74,30 ± 5,08
	<i>Roténone</i>	55,40 ± 9,11	55,84 ± 5,97
	<i>AA</i>	361,19 ± 38,72	488,14 ± 23,91 *

Tableau 19 : Effet d'un entraînement en endurance sur la production de peroxyde d'hydrogène (pmol d'H₂O₂/min/mg de protéines) de mitochondries de muscle provenant de rats contrôles ou entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min.

Les mitochondries de muscle (0,2 mg/ml) ont été incubées à 30°C dans le milieu suivant : 125mM KCl, 1 mM EGTA, 20 mM Tris, 0,15% BSA délipidée, 5mM Pi-Tris, pH 7,2 en présence de 1µM d'Amplex Red, 6U/ml d'HRP et supplémentée avec 4 conditions de substrats : soit glutamate/malate (5,5/2,5mM), soit succinate/roténone (5,5mM/2,5µM), soit glutamate/malate/succinate (5,5/2,5/5,5mM), soit palmitoyl-L-carnitine/malate (55µM/1mM). L'addition de 1,25µM de roténone permet d'inhiber le complexe I et l'addition de 1,5µM d'Antimycine A (AA), le complexe III. Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM avec n=10. *Différent du groupe contrôle (p < 0,05).

Effets de l'entraînement sur la production d'H₂O₂ de mitochondries musculaires

En présence de G/M, la production d'H₂O₂ est inchangée dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle (Tableau 19).

En présence de succinate, la production d'H₂O₂, similaire à l'état 2 et après ajout de roténone, est supérieure (+76%, p < 0,05) dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle (Tableau 19).

En présence de G/M/S, la production d'H₂O₂ qui est inchangée à l'état 2 devient significativement supérieure après ajout de roténone (+38%, p < 0,05) et d'AA (+78%, p < 0,05) dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle (Tableau 19).

L'utilisation de PC est associée à une production d'H₂O₂ supérieure uniquement après adjonction de roténone et d'AA (+35%, p < 0,05) dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle (Tableau 19).

3.3.2 Production radicalaire des mitochondries hépatiques

		Foie	
		Contrôle	Entraîné
Glutamate/Malate	<i>Etat 2</i>	17,99 ± 2,87	26,68 ± 1,66 *
	<i>Roténone</i>	33,80 ± 3,43	39,00 ± 4,80
	<i>AA</i>	84,99 ± 5,58	78,28 ± 10,97
Succinate	<i>Etat 2</i>	104,97 ± 9,89	135,23 ± 9,36 *
	<i>Roténone</i>	18,42 ± 2,26	23,17 ± 3,70
	<i>AA</i>	56,86 ± 6,04	58,92 ± 7,06
Glut/Mal/Succinate	<i>Etat 2</i>	109,83 ± 8,84	139,72 ± 7,65 *
	<i>Roténone</i>	53,32 ± 4,99	60,28 ± 6,88
	<i>AA</i>	92,26 ± 8,51	98,83 ± 9,84
Palmitoyl-L-Carnitine	<i>Etat 2</i>	25,68 ± 4,53	28,15 ± 1,34
	<i>Roténone</i>	23,26 ± 7,48	21,34 ± 4,60
	<i>AA</i>	99,85 ± 15,22	84,00 ± 9,28

Tableau 20 : Effet d'un entraînement en endurance sur la production de peroxyde d'hydrogène (pmol d'H₂O₂/min/mg de protéines) de mitochondries de foie provenant de rats contrôles ou entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min.

Les mitochondries de foie (0,25 mg/ml) ont été incubées à 30°C dans le milieu suivant : 125mM KCl, 1 mM EGTA, 20 mM Tris, 0,15% BSA délipidée, 5mM Pi-Tris, pH 7,2 en présence de 1µM d'Amplex Red, 6U/ml d'HRP et supplémentée avec 4 conditions de substrats : soit glutamate/malate (5,5/2,5mM), soit succinate/roténone (5,5mM/2,5µM), soit glutamate/malate/succinate (5,5/2,5/5,5mM), soit palmitoyl-L-carnitine/malate (55µM/1mM). L'addition de 1,25µM de roténone permet d'inhiber le complexe I et l'addition de 1,5µM d'Antimycine A, le complexe III. Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM avec n=10. * Différent du groupe contrôle (p < 0,05).

Effets de l'entraînement sur la production d'H₂O₂ de mitochondries hépatiques

La production d'H₂O₂, mesurée à l'état 2, est significativement supérieure dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle dans les conditions G/M (+48%, p < 0,05), succinate (+29%, p < 0,05) et G/M/S (+27%, p < 0,05) mais pas en présence de PC. L'utilisation d'inhibiteurs n'induit aucune modification de production d'H₂O₂ entre les groupes (Tableau 20).

ROS / JO₂ (état 2)	Foie		Muscle	
	Contrôle	Entraîné	Contrôle	Entraîné
Glutamate/Malate	1,57 ± 0,25	2,73 ± 0,29 *	2,0 ± 0,32	2,6 ± 0,36
Succinate	3,73 ± 0,38	5,75 ± 0,54 *	17,0 ± 2,4	21,9 ± 3,0
Glutamate/Malate + Succinate	3,33 ± 0,37	4,90 ± 0,30 *	12,9 ± 1,22	18,6 ± 3,11
Palmitoyl-L-Carnitine	1,53 ± 0,40	2,29 ± 0,25	1,1 ± 0,17	1,9 ± 0,24 *

Tableau 21 : Effet d'un entraînement en endurance sur le rapport entre la production de peroxyde d'hydrogène (pmol d'H₂O₂/min/mg prot) et la consommation d'oxygène (nmol d'O/min/mg prot) à l'état 2 de mitochondries de foie et de muscle provenant de rats contrôles ou entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min.

Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM avec n=10. * Différent du groupe contrôle (p < 0,05)

Au niveau hépatique, le rapport ROS/JO₂ est supérieur en présence de G/M (+74%, p < 0,05), de succinate (+54%, p < 0,05), de G/M/S (+47%, p < 0,05) et de PC (+49%, p < 0,08) dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle (Tableau 21).

Au niveau musculaire, le rapport ROS/JO₂ est significativement supérieur qu'en présence de PC (+73%, p < 0,05) et de G/M/S (+44%, p < 0,08) dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle (Tableau 21).

3.4 Stress oxydant et activité physique chronique

	Foie		Muscle	
	Contrôle	Entraîné	Contrôle	Entraîné
TBARS ($\mu\text{mol/g prot}$)	0,33 \pm 0,03	0,29 \pm 0,02	0,27 \pm 0,02	0,30 \pm 0,03
Thiols ($\mu\text{mol/g prot}$)	64,06 \pm 2,95	67,82 \pm 4,28	89,78 \pm 2,70	83,37 \pm 2,49
Statut Antioxydant Mitochondrial Total (UA)	42,53 \pm 1,12	43,34 \pm 0,99	44,52 \pm 1,68	39,75 \pm 0,59 *

Tableau 22 : Effet de l'entraînement en endurance sur la peroxydation lipidique (TBARS), l'oxydation protéique (Thiols) et l'activité du Statut Antioxydant Mitochondrial Totale dans le foie et le muscle de rats contrôles ou entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min.

Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM avec n=10. * Différent du groupe contrôle ($p < 0,05$).

L'entraînement en endurance réalisé dans ce travail n'induit pas de modification significative des marqueurs de la peroxydation lipidique (TBARS) ou de l'oxydation protéique (Thiols) entre les groupes entraîné et contrôle quelque soit le tissu étudié (Tableau 22).

Le statut antioxydant mitochondrial total, évalué par l'ajout d'une quantité connue d' H_2O_2 dans le milieu réactionnel, est inférieur dans le groupe entraîné (-11%, $p < 0,05$) par rapport au groupe contrôle au niveau musculaire. Sur mitochondrie hépatique, le statut antioxydant total est similaire dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle (Tableau 22).

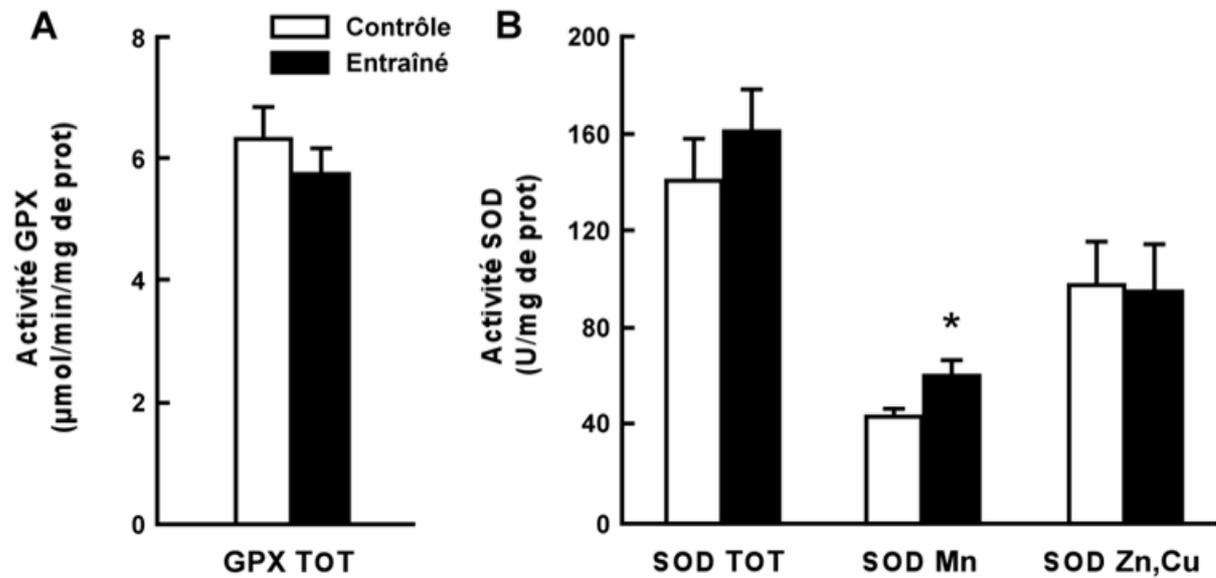


Figure 50 : Effets d'un entraînement en endurance sur l'activité de la glutathion peroxydase (A) et de la superoxyde dismutase (B) du foie de rats contrôles ou entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min.

GPX TOT: glutathion peroxydase totale en ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de prot), SOD TOT : superoxyde dismutase totale, SOD Mn : SOD mitochondriale, SOD Zn, Cu : SOD cytosolique en (U/mg de prot). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM avec $n=10$. * Différent du groupe contrôle ($p < 0,05$).

Au niveau hépatique, l'entraînement de 6 semaines en endurance sur tapis roulant n'entraîne pas de modification significative de l'activité totale de la GPX (Figure 50). L'activité totale de la SOD (SOD TOT) n'est pas significativement différente dans les deux groupes bien qu'une tendance à l'augmentation dans le groupe entraîné se dégage (Figure 50). La mesure des deux formes de la SOD (mitochondriale et cytosolique) révèle que l'activité de la forme mitochondriale (SOD Mn) est supérieure (+ 40,5%, $p < 0,05$) chez les rats entraînés par rapport aux contrôles alors que l'activité de la forme cytosolique (SOD Zn,Cu) est identique dans les deux groupes (Figure 50).

3.5 Activités enzymatiques et activité physique chronique

	Foie		Muscle	
	Contrôle	Entraîné	Contrôle	Entraîné
Citrate Synthase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot, mitochondriale)	156,48 \pm 2,87	179,79 \pm 4,78 *	1632,65 \pm 63,91	1731,23 \pm 101,92
Complexe I (nmol/min/mg protéine)	576,56 \pm 88,07	735,45 \pm 101,12	3550,32 \pm 290,36	4342,40 \pm 398,54
Complexe II (nmol/min/mg protéine)	95,10 \pm 5,20	86,29 \pm 6,48	213,19 \pm 18,17	204,19 \pm 8,52
Complexe IV (nmol/min/mg protéine)	496,00 \pm 18,5	485,22 \pm 26,7	1791,02 \pm 89,3	1636,10 \pm 68,6

Tableau 23 : Effet de l'entraînement en endurance sur les activités de citrate synthase tissulaire et mitochondriale et sur l'activité mitochondriales des complexes I, II et IV extrait de foie et muscle de rats contrôles ou entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min.

Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM avec n=10. * Différent du groupe contrôle ($p < 0.05$).

Le protocole d'entraînement en endurance utilisé est associé à des différences d'activité de la citrate synthase (CS) par quantité de protéine mitochondriale (Tableau 23). En effet, l'activité de la CS est supérieure dans les mitochondries de foie (+ 15 %, $p < 0,05$) des rats entraînés par rapport aux contrôles.

L'activité des complexes I, II et IV de la chaîne respiratoire, des deux tissus étudiés, est similaire dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle (Tableau 23).

3.6 Expression protéique et activité physique chronique

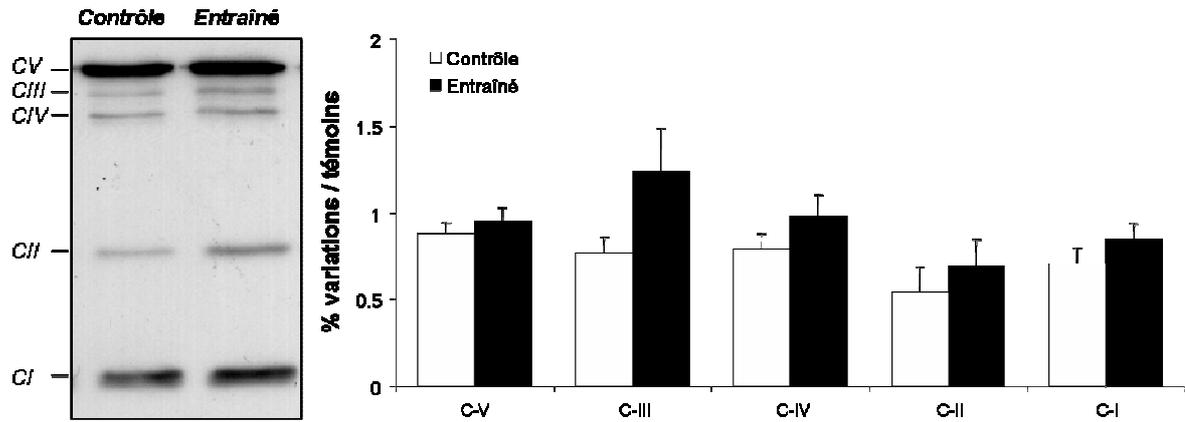


Figure 51 : Effet d'un entraînement en endurance sur le contenu protéique en complexes V, III, IV, II et I de la chaîne respiratoire mitochondriale mesuré sur mitochondries musculaires de rats contrôles ou entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min.

Le contenu protéique en complexes de la chaîne respiratoire a été évalué simultanément par Western Blot avec un cocktail d'anticorps anti-OXPHOS sur des mitochondries de quadriceps.

Le contenu protéique en complexes I, II, III (+63%, $p < 0,07$ NS), IV et V de la chaîne respiratoire de mitochondries musculaire n'est pas significativement différent dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle (Figure 51).

3.7 Discussion

Dans cette deuxième partie de notre travail nous nous sommes intéressés aux effets d'une activité physique chronique modérée sur les adaptations fonctionnelles de mitochondries musculaires et hépatiques. A travers les paramètres de mesure de la consommation d'oxygène et de production d' H_2O_2 , nous avons pu mettre en évidence que l'entraînement en endurance n'augmentait pas les capacités oxydatives mitochondriales. L'utilisation de la mesure de production d' H_2O_2 mitochondriale nous a elle permis de déceler des sites tissus spécifiques d'adaptations. Une augmentation de cette production en condition stimulée, sans altérations oxydatives tissulaires contrôlée par une activité MnSOD en excès nous a permis d'émettre l'hypothèse d'un rôle potentiel des ROS dans le processus de signalisation menant aux adaptations cellulaires à l'exercice.

Si l'activité physique chronique est reconnue pour augmenter la consommation d'oxygène sur l'organisme entier (Tonkonogi et coll., 2000), les résultats d'adaptations de la chaîne respiratoire à l'entraînement sont peu connus au niveau musculaire et inexistantes au niveau hépatique.

Respiration mitochondriale et exercice chronique

Nos mesures de respirations ne laissent apparaître aucune modification de la consommation d'oxygène au niveau des mitochondries de muscle lors d'une stimulation de la phosphorylation avec de l'ADP, mimant l'état d'exercice (Tableau 17). Dans une étude réalisée sur mitochondries musculaires, aucune différence de respiration mitochondriale aux états 2 et 3 respiratoire n'est observée en présence de succinate ou de pyruvate/malate à la suite d'un entraînement en endurance de 10 semaines (Venditti et coll., 1999). Les principales études réalisées sur les effets de l'entraînement en endurance sur la respiration mitochondriale sont réalisées uniquement à partir de substrats du complexe I ou du complexe II (Pyruvate ou glutamate/malate vs succinate) (Molnar et coll., 2006, Servais et coll., 2003, Venditti et coll., 1999).

De façon originale, l'étude de respiration avec un acide gras à chaîne longue, nous a permis d'observer à l'état basal une adaptation mitochondriale spécifique de ce substrat. En effet la respiration en présence de palmitoyl-L-carnitine, acides gras à chaîne longue (C16), est significativement inférieure dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle. En présence d'oligomycine, inhibiteur des ATP synthases, cette différence n'est plus relevée. Il apparaît donc que cette modification de respiration basale observée lors de l'utilisation des acides gras est liée à une diminution de l'activité ATPasiques. En présence de découplant (DNP) on observe que la respiration est augmentée lors de l'utilisation des acides gras. Cela suggère une meilleure efficacité de la chaîne à extraire des équivalents réduits en provenance des acides gras, révélant une augmentation de la stœchiométrie H^+/O au niveau de la chaîne respiratoire. Le transfert d'électrons issus des acides gras permettrait alors une éjection de protons plus importante. On aurait donc suite à l'entraînement en endurance, une amélioration du *redox slipping* au niveau musculaire (Pietrobon et coll., 1983). Le fait que nous n'observions ce résultat qu'en présence d'acide gras, nous permettrait de faire l'hypothèse qu'il s'agit en fait d'un *slipping métabolique* correspondant à un changement de la fourniture d'électrons aux différents complexes de la chaîne respiratoire (Pietrobon et coll., 1987).

En se basant sur des études réalisées sur mitochondries isolées, il semble possible d'extrapoler les conséquences de modifications mitochondriale sur des cellules intactes (Leverve et coll., 1998). Nous pourrions donc imaginer que cette adaptations se retrouve jusqu'au niveau tissulaire.

Il est reporté depuis longtemps que l'entraînement en endurance améliore de façon générale l'oxydation des acides gras (Gollnick et Saltin, 1982, Holloszy et Booth, 1976). Nous pouvons confirmer que dans notre expérimentation, la modification mitochondriale spécifique à l'entraînement n'est pas liée à une entrée facilitée des acides gras ou une augmentation des activités enzymatiques de la β -oxydation. Ce sont les mesures réalisées en condition phosphorylante qui nous permettent d'étayer cette hypothèse. En présence d'ADP, l'accélération de l'entrée des équivalents réduits issus de la β -oxydation dépendante de l'entrée des substrats lipidiques dans la mitochondrie via les transporteurs spécifiques (CPT) n'est pas influencée par l'entraînement. Il semblerait que nous ayons pu à l'aide de notre modèle d'exercice modéré apporter une explication mécanistique au profil particulier du sujet entraîné vis à vis de l'utilisation des acides gras. Cette adaptation se situerait principalement au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette donnée renforce la place importante de la mitochondrie dans la régulation de l'homéostasie lipidique cellulaire.

A l'exercice, la redistribution importante du flux sanguin vers les tissus effecteurs permet un apport énergétique orienté vers l'efficacité musculaire. Pendant ce temps, le foie est le seul organe à être capable d'approvisionner en glucose via la circulation systémique les cellules n'utilisant que ce substrat telles que les globules rouges et les cellules cérébrales (Ghanassia et coll., 2007). L'amélioration de la fourniture d'énergie glucidique au cerveau pourrait permettre de retarder l'apparition d'une fatigue centrale liée à une disfonctionnement des cellules nerveuse.

Il a été montré que le foie répondait à l'entraînement par une augmentation de l'activité néoglucogénique (Donovan et Sumida, 1997). Cependant ce processus est consommateur d'énergie. L'étude dans le foie des effets de l'entraînement sur le fonctionnement de l'oxydation phosphorylante, source d'un apport énergétique important à l'exercice, nous est alors apparue comme intéressante.

Sur le tissu hépatique, nous avons pu relever une diminution significative de la respiration en condition phosphorylante, d'environ -20%, dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle, avec l'ensemble des substrats apportant des équivalents réduits au niveau du complexe I (Tableau 18). Cette tendance est relevée en présence de succinate seul mais ne

ne passe pas sous le seuil de significativité. Ces résultats peuvent être dus à une amélioration du couplage entre oxydation et phosphorylation dans les conditions de stimulation importante de la chaîne respiratoire. En parallèle de ces résultats, nous avons pu mesurer une augmentation de l'activité citrate synthase exprimée par quantité de tissu mais aussi exprimée par quantité de protéines mitochondriales. Dans le foie, tout se passe comme si l'entraînement augmentait le contenu en unité énergétique ou chaîne respiratoire de la mitochondrie et qu'à cela chacune de ces unités s'adapterait en ralentissant leur fonctionnement. Ces adaptations semblent primordiales dans les processus d'économie d'énergie dans les conditions de repos mais aussi dans les mécanismes d'adaptation rapide à un accroissement brutal de la demande énergétique.

De ce premier résultat général sur un fonctionnement plus efficace de la chaîne respiratoire dans des conditions stimulées, il ressort une adaptation spécifique au niveau du complexe I de la chaîne d'oxydation phosphorylante (Tableau 18). En présence de glutamate/malate, substrat fournissant du NADH au complexe I, la respiration en condition découplée est significativement supérieure dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle (Tableau 18, G/M). Nous aurions donc révélé au niveau hépatique une amélioration du couplage mitochondrial liée à une augmentation de l'expulsion de protons couplée à l'oxydation du NADH par la première pompe de la chaîne, le complexe I. Cette modification observée au niveau du complexe I n'est pas liée à une augmentation d'activité du complexe I ni du complexe II mesurée en spectrométrie (Tableau 18). Il ne semble donc pas que cette production modifiée soit attribuable à une modification de l'entrée des équivalents réduits dans la chaîne respiratoire.

L'étude de la consommation d'oxygène révèle des adaptations mitochondriales tissus spécifiques. On observe un couplage mitochondrial amélioré en présence d'acides gras dans le muscle et dans les conditions alimentant majoritairement le complexe I dans le foie.

Production d'H₂O₂ mitochondriale et exercice chronique

Comme dans la première partie de cette étude, nous avons utilisé la mesure de production d'H₂O₂ pour mettre en évidence d'éventuelles modifications fonctionnelles de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Dans le muscle nous avons pu mettre en évidence la persistance des mécanismes observés à la suite de l'exercice unique. En effet il apparaît que l'entraînement modifie principalement la production au niveau du complexe III de la chaîne respiratoire. Nous n'observons aucune modification de la production lorsque le complexe I est alimenté avec du glutamate/malate et que le flux d'électrons est stoppé au niveau de ce complexe par la roténone (Tableau 19). Nous n'observons aucune différence même au travers du flux reverse engendré par les conditions de mesures en présence de succinate. Cependant l'inhibition du flux d'électrons au niveau du complexe III, par ajout d'Antimycine A, induit une augmentation de +35 à +78% dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle dans les conditions où les électrons rentrent dans la chaîne respiratoire en aval du complexe I (Tableau 19). Il semble donc que l'entraînement ait un effet spécifique au niveau du complexe III. Cet argument concorde avec une augmentation assez spécifique d'environ 60% (NS) du contenu protéique en complexe III mesurée parallèlement à l'ensemble des autres complexes de la chaîne respiratoire.

Dans le foie, l'entraînement en endurance semble modifier la production radicalaire principalement au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire. Nous pouvons émettre cette hypothèse à partir des résultats de production d' H_2O_2 en conditions basales avec la seule présence des substrats (Tableau 20). En effet la production est supérieure dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle en présence de G/M (+48%) alimentant le complexe I et en présence de succinate (+29%) et G/M/S (+27%), conditions qui potentialisent le flux inverse d'électrons du complexe II vers le complexe I. De plus cette augmentation de la production en condition basale n'est pas influencée par l'ajout d'inhibiteur du complexe III (Tableau 20) dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle.

Alors que de nombreux auteurs minimisent le rôle de la production de ROS mitochondriale en la considérant comme artéfactuelle et ne pouvant être mise en évidence qu'en présence d'inhibiteurs (Nohl et coll., 2005, Staniek et Nohl, 2000, St-Pierre et coll., 2002), nous montrons dans ce travail que la production de ROS est modifiée dans les groupes étudiés même en conditions basales de respiration.

La possibilité d'une interférence dans l'interprétation mécanistiques de nos mesures avec le statut antioxydant mitochondrial semble à exclure. L'augmentation de l'activité de la MnSOD mitochondriale (Figure 50) pourrait expliquer une réduction plus importante des anions superoxyde produits en H_2O_2 et augmenter ainsi le signal de façon artéfactuelle. Cependant, si nous prenons l'exemple du G/M dans le foie (Tableau 18), cette mesure fait apparaître une différence à l'état basal qui n'est pas visible en présence d'inhibiteur du

complexe III provoquant des productions supérieures. Concernant l'activité GPx, qui réduit l' H_2O_2 en H_2O et pourrait induire une perte de signal en cas d'activité augmentée est inchangée dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle (Figure 50). De façon intéressante il semblerait plutôt que les ROS produits pendant l'activité physique puissent améliorer les systèmes de défenses antioxydantes pour limiter les effets délétères des surproductions radicalaires. Cette voie de signalisation impliquerait les facteurs NF- κ B et AP-1 sensible à l' H_2O_2 . Pour expliquer que seule l'enzyme antioxydante MnSOD mitochondriale réponde suite à notre protocole d'entraînement, une étude a montré que seul le promoteur MnSOD contenait un site d'accroche de NF- κ B et AP-1 sensible aux ROS (Jones et coll., 1995).

Notre protocole d'entraînement modéré ne semble pas provoquer un stress oxydant majeur induisant des dégâts cellulaires. Il apparaît que les index de peroxydations lipidiques (TBARS) et d'oxydations des protéines (Thiols) sont similaires dans le groupe entraîné par rapport au groupe contrôle que ce soit au niveau musculaire ou hépatique (Tableau 22). On observe dans le foie une modification des défenses antioxydantes influençant la réduction de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, mais aucune modification de la GPx enzyme majoritaire au niveau hépatique dans la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau. L'association d'une absence de dégâts cellulaires à une augmentation de la production d' H_2O_2 , non lié à une baisse des défenses antioxydantes, tend à confirmer le rôle probable de concentrations cellulaires tolérées de ROS dans un processus d'adaptation mitochondrial à l'exercice. L' H_2O_2 non « détoxifié » pourrait agir sur les voies de signalisation impliquées dans les adaptations fonctionnelles de la mitochondrie.

4 Effet de l'administration de PGC-1 α /AS sur le fonctionnement mitochondrial

Le coactivateur transcriptionnel PGC-1 α est considéré à ce jour comme une voie « inévitable » dans le processus de biogenèse mitochondriale (Hood et Saleem, 2007, Lin et coll., 2005, St-Pierre et coll., 2006). Dans cette partie, nous avons souhaité préciser si les adaptations mises en évidence à la suite d'un entraînement en endurance passaient principalement par cette voie de signalisation. Pour cela nous avons comparé à un groupe entraîné, un groupe entraîné subissant une injection quotidienne d'oligonucléotide antisens de PGC-1 α (Ent+PGC-1 α /AS). La constitution d'un groupe subissant une injection quotidienne de PGC-1 α /AS sans réalisation d'exercice, nous a permis de nous affranchir de mécanismes inflammatoires pouvant être induits par l'injection.

4.1 Effet général du traitement à l'oligo antisens de PGC-1 α

4.1.1 Validation du traitement intra-péritonéal PGC-1 α /AS

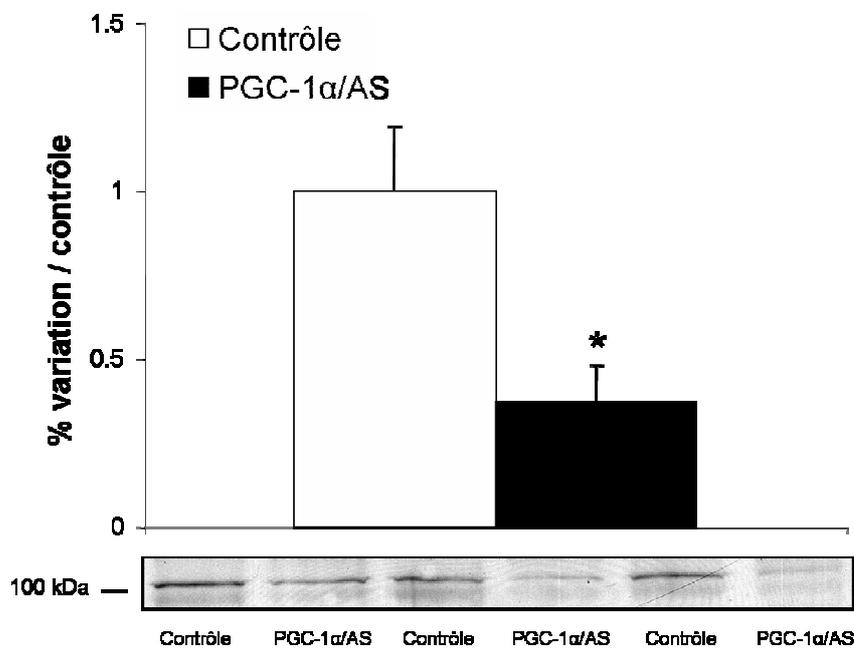


Figure 52 : Effet du traitement anti-PGC-1 α sur le contenu protéique en PGC-1 α de muscle de rats contrôles et traités à l'antisens de PGC-1 α .

Le contenu protéique en PGC-1 α a été évalué par Western Blot avec l'anticorps anti-PGC-1 α sur des homogénats de quadriceps. Les résultats sont exprimés en % de variation/contrôle. * Différent du groupe contrôle ($p < 0,05$).

Le traitement par injection d'oligonucléotides antisens de PGC-1 α induit une diminution de l'expression de la protéine PGC-1 α d'environ 70% comparativement à un groupe contrôle (Figure 52).

4.1.2 Rôle de PGC-1 α dans la biogenèse mitochondriale

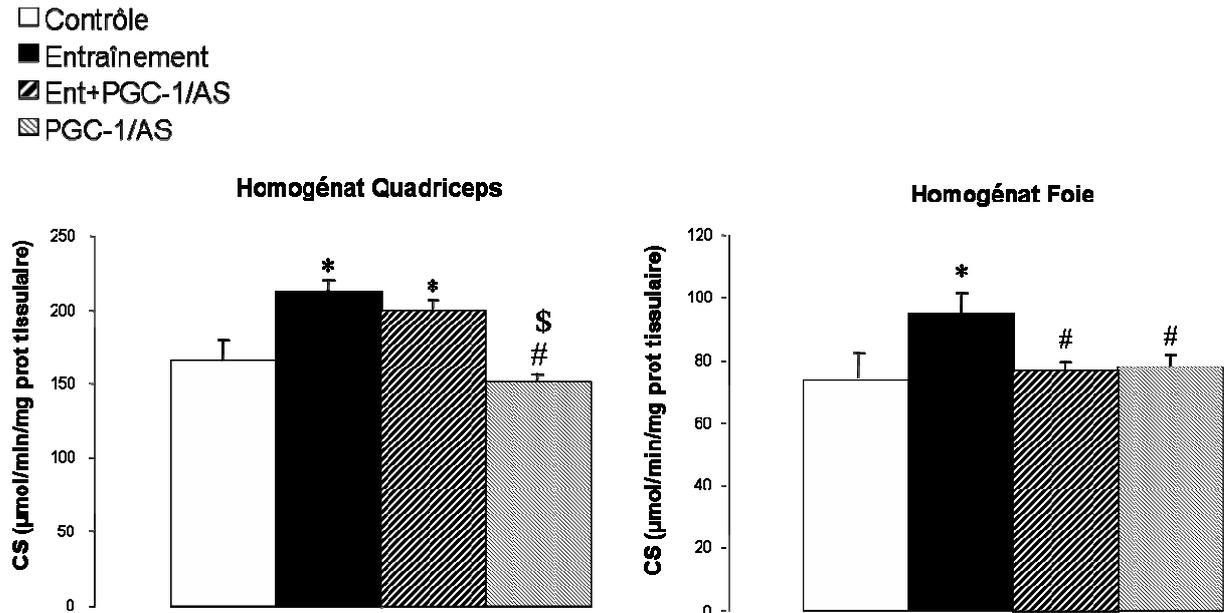


Figure 53 : Effet du traitement anti-PGC-1 α sur l'activité citrate synthase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéine tissulaire) mesuré sur homogénats musculaires et hépatiques, de rats contrôles, entraînés 6 semaines (Entraînement), entraînés et traités aux oligonucléotides antisens de PGC-1 α pendant 6 semaines (Entraînement + PGC-1 α /AS) et traités aux oligonucléotides antisens de PGC-1 α pendant 6 semaines (PGC-1 α /AS).

* Différent du groupe contrôle # Différent du groupe entraîné \$ Différent du groupe Entraîné + PGC-1 α /AS.

L'activité de la CS est supérieure dans le quadriceps (+ 28 %, $p < 0,05$) des rats entraînés par rapport aux contrôles ($212,4 \pm 8,4 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de prot. tissulaire vs $166,4 \pm 13,9$ respectivement). La même évolution est observée dans le foie avec une augmentation de 16 % ($p < 0,05$) chez les rats entraînés par rapport aux contrôles ($94,8 \pm 6,4 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de prot. tissulaire vs $82,0 \pm 7,9$, respectivement) (Figure 53).

L'activité de la citrate synthase dans le groupe entraîné ayant subi une injection d'antisens de PGC-1 α (Ent+PGC-1/AS) est supérieure dans le quadriceps (+ 20%, $p < 0,05$) par rapport au groupe contrôle ($199,1 \pm 7,2 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de prot. tissulaire vs $166,4 \pm 13,9$ respectivement) et similaire par rapport au groupe entraîné. Cette activité est inférieure dans le foie (- 19%, $p < 0,05$) par rapport au groupe entraîné ($76,6 \pm 3,1 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de prot tissulaire vs $94,8 \pm 6,4$, respectivement) (Figure 53).

Dans le groupe PGC-1/AS, l'activité CS est significativement inférieure dans le quadriceps par rapport au groupe entraîné (- 29%, $p < 0,05$) et Ent+PGC-1/AS (- 24%, $p < 0,05$). L'activité CS dans le foie est inférieure de 18% ($p < 0,05$) dans le groupe PGC-1/AS par rapport au groupe entraîné.

4.1.3 Discussion intermédiaire

À la suite du traitement antisens, la mesure d'expression protéique de PGC-1 α sur homogénat musculaire révèle une diminution de 70% du contenu protéique dans le groupe traité par rapport à un groupe contrôle. Nous retrouvons les valeurs obtenues dans la littérature concernant l'efficacité de ce traitement réalisé par injection simple par voie intra-péritonéale (De Souza et coll., 2005, Oliveira et coll., 2004).

L'activité de la citrate synthase, index de la biogenèse mitochondriale, est influencée de manière différente par l'injection intra-péritonéale de l'oligonucléotide antisens de PGC-1 α selon le tissu étudié.

Dans l'homogénat de muscle quadriceps (Figure 53), on remarque que l'entraînement qui induit une biogenèse mitochondriale n'est pas influencé par l'inhibition de PGC-1 α .

Si on compare les groupes entraîné et Ent+PGC-1/AS, on constate que le traitement PGC-1/AS n'a pas d'effet significatif sur la biogenèse. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le muscle est capable de stimuler une biogenèse mitochondriale sans solliciter le coactivateur transcriptionnel PGC-1 α . Il est envisageable qu'en absence de la voie PGC-1 α , l'entraînement stimule d'autres voies de signalisation. Nous avons constaté en accord avec la littérature (Oliveira et coll., 2004) que notre traitement induisait une diminution importante mais pas une inhibition totale de la traduction protéique. Il est donc possible que dans le muscle, l'activité résiduelle du coactivateur en partie inhibée par notre traitement soit suffisante pour induire le processus de biogenèse lié à l'entraînement.

En comparant les groupes Ent+PGC-1/AS et PGC-1/AS, on remarque qu'en présence du traitement PGC-1/AS, l'entraînement réussit à induire une biogenèse. On confirme donc nos précédentes hypothèses en s'affranchissant d'un possible effet délétère de notre injection intra-péritonéale.

Dans l'homogénat hépatique, on peut voir que la biogenèse induite par l'entraînement n'est pas maintenue dans le groupe Entraîné+PGC-1 α /AS. Il semblerait donc que le foie ne

soit pas capable d'activer d'autres voies de signalisation pour induire le processus de biogenèse mitochondriale.

De nombreux facteurs contrôlent la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale observée lors d'adaptations physiologiques et métaboliques. Parmi eux, on trouve les facteurs nucléaires respiratoires (NRF-1 et 2), les récepteurs au facteur activé de prolifération des peroxyosomes (PPAR α et γ), la protéine de spécificité 1 (Sp1) et les produits immédiats des gènes précoces, les protéines régulatrices de gènes (c-jun et c-fos) (Hood, 2001).

Une étude réalisée sur souris PGC-1 α $-/-$ révèle une intolérance à l'exercice (Leone et coll., 2005) marquée par une diminution importante du temps de maintien d'activité sur tapis roulant. Les souris KO (Knock Out) ne réussissent à tenir qu'une minute de course contre dix pour les souris sauvages. Dans notre étude nous n'avons pas observé pour les rats du groupe Ent+PGC-1 α /AS de difficultés majeures dans la réalisation de l'entraînement. Cela renforce le fait qu'en présence d'une faible portion de PGC-1 α encore présente, l'organisme est sans doute capable de s'adapter aux contraintes induites par l'exercice en stimulant partiellement la voie PGC-1 α .

4.2 Fonctionnement mitochondrial et traitement PGC-1 α /AS

4.2.1 Consommation d'oxygène et traitement PGC-1 α /AS

4.2.1.1 PGC-1 α /AS et consommation d'oxygène de mitochondries musculaires

		MUSCLE		
		Entraînement	Entraînement + PGC-1 α /AS	PGC-1 α /AS
Glutamate/ Malate	<i>Etat 2</i>	30,40 \pm 3,36	36,30 \pm 1,02	33,44 \pm 1,26
	<i>Etat 3</i>	438,00 \pm 34,12	490,20 \pm 14,45	516,25 \pm 10,13
	<i>Etat 4</i>	22,80 \pm 2,54	28,00 \pm 1,25 #	25,33 \pm 2,05
	<i>DNP</i>	423,88 \pm 52,62	433,20 \pm 18,47	462,44 \pm 20,28
	<i>RCR</i>	20,49 \pm 2,22	17,72 \pm 0,76	22,08 \pm 1,98
Succinate	<i>Etat 2</i>	106,30 \pm 8,38	120,20 \pm 3,61	116,44 \pm 3,11
	<i>Etat 3</i>	420,40 \pm 31,31	501,70 \pm 18,20	478,89 \pm 16,37
	<i>Etat 4</i>	90,80 \pm 6,76	112,50 \pm 3,10 #	113,78 \pm 4,00
	<i>DNP</i>	380,88 \pm 20,37	421,90 \pm 9,33	424,89 \pm 15,41
	<i>RCR</i>	4,65 \pm 0,15	4,47 \pm 0,14	4,24 \pm 0,18
Glut/Mal/ Succinate	<i>Etat 2</i>	112,10 \pm 7,70	117,10 \pm 4,85	116,78 \pm 3,09
	<i>Etat 3</i>	634,00 \pm 47,78	689,40 \pm 23,74	711,78 \pm 17,39
	<i>Etat 4</i>	97,60 \pm 7,17	109,70 \pm 3,87	111,33 \pm 3,17
	<i>DNP</i>	562,88 \pm 23,24	481,33 \pm 18,32 #	557,56 \pm 19,93 \$
	<i>RCR</i>	6,53 \pm 0,22	6,29 \pm 0,06	6,41 \pm 0,15
Palmitoyl-L- Carnitine	<i>Etat 2</i>	41,33 \pm 3,38	43,30 \pm 2,21	52,89 \pm 4,43
	<i>Etat 3</i>	274,89 \pm 20,02	246,78 \pm 8,95	251,11 \pm 11,91
	<i>Etat 4</i>	30,44 \pm 2,48	32,50 \pm 1,12	30,63 \pm 1,37
	<i>DNP</i>	291,57 \pm 27,35	259,44 \pm 12,11	252,44 \pm 16,60
	<i>RCR</i>	9,14 \pm 0,49	7,81 \pm 0,48	8,39 \pm 0,50
TMPD/Asc +DNP		1255,78 \pm 94,21	1190,60 \pm 54,32	1243,38 \pm 23,60

Tableau 24 : Effet d'un entraînement en endurance sur la consommation d'oxygène (nmol d'O/min/mg prot), le contrôle respiratoire (RCR) et l'activité de la cytochrome oxydase (TMPD/Asc+DNP) de mitochondries de muscle provenant de rats entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min, de rats entraînés et traités à l'antisens de PGC-1 α et de rats traités à l'antisens de PGC-1 α uniquement.

Le protocole expérimental est similaire aux expériences précédentes. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM avec n=10. # Différent du groupe entraîné, \$ Différent du groupe entraîné + PGC-1 α /AS (p < 0,05).

L'injection d'un oligonucléotide antisens de PGC-1 α (PGC-1/AS) est associée à des différences de respiration mitochondriale sur le tissu musculaire (Tableau 24). Les respirations sont similaires quelques soient les substrats, aux états 2 et 3, dans le groupe Ent+PGC-1/AS par rapport au groupe entraîné et dans le groupe PGC-1/AS par rapport au groupe Ent+PGC-1/AS. La respiration à l'état 4 est supérieure en présence de G/M (+ 23 %, $p < 0,05$) et en présence de succinate (+ 24 %, $p < 0,05$) dans le groupe Ent+PGC-1/AS par rapport au groupe entraîné.

En condition découplée, la respiration est inférieure dans le groupe Ent+PGC-1/AS (- 14 %, $p < 0,05$) par rapport au groupe entraîné et inférieure (- 14 %, $p < 0,05$) par rapport au groupe PGC-1/AS lorsque la chaîne est stimulée dans sa globalité (G/M/S) (Tableau 24).

L'activité de la cytochrome oxydase déterminée par oxygraphie (TMPD/Asc+DNP) n'est pas différente entre les groupes (Tableau 24).

4.2.1.2 PGC-1 α /AS et consommation d'oxygène de mitochondries hépatiques

		FOIE		
		Entraînement	Entraînement + PGC-1 α /AS	PGC-1 α /AS
Glutamate/ Malate	<i>Etat 2</i>	10,54 \pm 1,09	11,84 \pm 0,36	11,33 \pm 0,47
	<i>Etat 3</i>	110,78 \pm 8,29	125,44 \pm 4,02	119,82 \pm 6,07
	<i>Etat 4</i>	7,38 \pm 0,71	7,20 \pm 0,26	6,10 \pm 0,46
	<i>DNP</i>	89,55 \pm 6,31	46,52 \pm 3,49 #	37,42 \pm 4,39
	<i>RCR</i>	15,60 \pm 1,15	17,59 \pm 0,82	19,28 \pm 0,76
Succinate	<i>Etat 2</i>	26,02 \pm 2,21	27,00 \pm 0,60	26,27 \pm 0,94
	<i>Etat 3</i>	163,56 \pm 12,59	192,32 \pm 4,72	186,80 \pm 6,62
	<i>Etat 4</i>	18,60 \pm 2,01	18,68 \pm 0,45	16,76 \pm 1,17
	<i>DNP</i>	140,10 \pm 6,38	133,64 \pm 4,69	97,20 \pm 9,00 \$
	<i>RCR</i>	9,26 \pm 0,74	10,33 \pm 0,28	11,37 \pm 0,49
Glut/Mal/ Succinate	<i>Etat 2</i>	30,72 \pm 2,46	33,04 \pm 1,21	29,78 \pm 1,67
	<i>Etat 3</i>	172,96 \pm 13,08	201,80 \pm 8,04	181,10 \pm 5,49
	<i>Etat 4</i>	21,84 \pm 1,55	24,24 \pm 1,02	20,18 \pm 1,57 \$
	<i>DNP</i>	158,30 \pm 12,28	140,36 \pm 6,64	108,05 \pm 6,69 \$
	<i>RCR</i>	7,93 \pm 0,24	8,35 \pm 0,18	9,60 \pm 0,67 \$
Palmitoyl-L- Carnitine	<i>Etat 2</i>	13,42 \pm 1,04	16,32 \pm 0,38	14,76 \pm 0,67
	<i>Etat 3</i>	75,36 \pm 6,65	74,36 \pm 1,56	59,80 \pm 2,02 \$
	<i>Etat 4</i>	11,32 \pm 0,78	10,20 \pm 0,36	8,98 \pm 0,69
	<i>DNP</i>	68,90 \pm 8,54	44,40 \pm 4,81	31,24 \pm 3,36
	<i>RCR</i>	6,67 \pm 0,46	7,35 \pm 0,27	7,08 \pm 0,60
TMPD/Asc +DNP		281,68 \pm 23,80	309,24 \pm 12,03	330,44 \pm 13,13

Tableau 25 : Effet d'un entraînement en endurance sur la consommation d'oxygène (nmol d'O/min/mg prot), le contrôle respiratoire (RCR) et l'activité de la cytochrome oxydase (TMPD/Asc+DNP) de mitochondries de foie provenant de rats entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min, de rats entraînés et traités à l'antisens de PGC-1 α et de rats traités à l'antisens de PGC-1 α uniquement.

Le protocole expérimental est similaire aux expériences précédentes. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM avec n=10. # Différent du groupe entraîné, \$ Différent du groupe entraîné + PGC-1 α /AS (p < 0.05).

L'injection d'un oligonucléotide antisens de PGC-1 α (PGC-1 α /AS) utilisée dans ce travail est associée à des différences de respiration mitochondriale sur le tissu hépatique (Tableau 25).

A l'état 2, la respiration est similaire quelques soient les substrats dans le groupe Ent+PGC-1/AS par rapport au groupe entraîné et au groupe PGC-1/AS. La respiration à l'état 3 est inférieure uniquement en présence de PC (- 20 %, $p < 0,05$) dans le groupe PGC-1/AS par rapport au groupe Ent+PGC-1/AS (Tableau 25). La respiration à l'état 4 est plus faible de 17% ($p < 0,05$) en condition de stimulation globale de la chaîne (G/M/S)

En condition découplée, la respiration est inférieure dans le groupe Ent+PGC-1/AS (- 48 %, $p < 0,05$) par rapport au groupe entraîné en présence de G/M. La respiration est inférieure en présence de succinate (-27 %, $p < 0,05$) et de G/M/S (-23 %, $p < 0,05$) dans le groupe PGC-1/AS par rapport au groupe Ent+PGC-1/AS (Tableau 25).

L'activité de la cytochrome oxydase déterminée par oxygraphie (TMPD/Asc+DNP) n'est pas différente entre les groupes (Tableau 25).

4.2.2 Production radicalaire et traitement PGC-1 α /AS

4.2.2.1 PGC-1 α /AS et production d'H₂O₂ de mitochondries musculaires

		MUSCLE		
		Entraînement	Entraînement + PGC-1 α /AS	PGC-1 α /AS
Glutamate/ Malate	<i>Etat 2</i>	72,26 \pm 3,56	78,26 \pm 3,21	90,78 \pm 3,61
	<i>Roténone</i>	102,79 \pm 21,41	193,05 \pm 25,70 #	125,03 \pm 5,13 \$
	<i>AA</i>	391,28 \pm 39,77	468,32 \pm 36,61	315,00 \pm 13,65 \$
Succinate	<i>Etat 2</i>	2197,29 \pm 239,07	2309,45 \pm 132,40	1996,95 \pm 235,28
	<i>Roténone</i>	108,53 \pm 21,48	132,89 \pm 11,04	131,46 \pm 2,53
	<i>AA</i>	590,64 \pm 49,59	604,86 \pm 37,61	486,87 \pm 9,87
Glut/Mal/ Succinate	<i>Etat 2</i>	1938,68 \pm 225,56	1904,60 \pm 233,42	1618,91 \pm 114,45
	<i>Roténone</i>	275,65 \pm 31,31	359,44 \pm 22,99 #	252,72 \pm 7,23 \$
	<i>AA</i>	814,79 \pm 61,67	966,03 \pm 38,37	667,24 \pm 15,87 \$
Palmitoyl-L- Carnitine	<i>Etat 2</i>	74,30 \pm 5,08	78,91 \pm 2,81	92,56 \pm 5,72
	<i>Roténone</i>	55,84 \pm 5,97	80,75 \pm 6,85 #	86,17 \pm 5,44
	<i>AA</i>	488,14 \pm 23,91	613,58 \pm 37,04 #	474,99 \pm 29,85 \$

Tableau 26 : Effet d'un entraînement en endurance sur la production de peroxyde d'hydrogène (pmol d'H₂O₂/min/mg de protéines) de mitochondries de muscle provenant de rats contrôles ou entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min.

Le protocole expérimental est similaire aux expériences précédentes. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM avec n=10. # Différent du groupe entraîné, \$ Différent du groupe entraîné + PGC-1 α /AS (p < 0,05)

La production d'H₂O₂ est similaire quelques soient les substrats à l'état 2 respiratoire dans le groupe Ent+PGC-1/AS par rapport au groupe entraîné et dans le groupe PGC-1/AS par rapport au groupe Ent+PGC-1/AS (Tableau 26).

L'utilisation d'inhibiteurs des complexes I (roténone) et III (AA) est associée à des différences de production d'H₂O₂ par les mitochondries musculaires (Tableau 26).

En présence de G/M, la production d'H₂O₂ après ajout de roténone est supérieure dans le groupe Ent+PGC-1/AS (+88 %, p < 0,05) par rapport au groupe entraîné et par rapport au groupe PGC-1/AS (+35 %, p < 0,05). L'ajout d'AA induit une production d'H₂O₂ inférieure dans le groupe PGC-1/AS par rapport au groupe Ent+PGC-1/AS (-33 %, p < 0,05) (Tableau 26).

En présence de succinate, la production d'H₂O₂ est similaire quelques soient les inhibiteurs dans le groupe Ent+PGC-1/AS par rapport au groupe entraîné et dans le groupe PGC-1/AS par rapport au groupe Ent+PGC-1/AS (Tableau 26).

Lorsqu'on alimente la chaîne dans sa globalité, la production d'H₂O₂ est supérieure en présence de G/M/S dans le groupe Ent+PGC-1/AS (+30 %, p < 0,05) par rapport au groupe entraîné et inférieure dans le groupe PGC-1/AS (-30 %, p < 0,05) par rapport au groupe Ent+PGC-1/AS, lorsque le complexe I est inhibé. Après adjonction d'AA, la production d'H₂O₂ est inférieure dans le groupe PGC-1/AS (-30 %, p < 0,05) par rapport au groupe Ent+PGC-1/AS (Tableau 26). En présence de PC la production d'H₂O₂ est supérieure après ajout de roténone dans le groupe Ent+PGC-1/AS (+45 %, p < 0,05) par rapport au groupe entraîné. Après adjonction d'AA, la production d'H₂O₂ est supérieure dans le groupe Ent+PGC-1/AS (+26 %, p < 0,05) par rapport au groupe entraîné et inférieure dans le groupe PGC-1/AS (-23%, p < 0,05) par rapport au groupe Ent+PGC-1/AS (Tableau 26).

4.2.2.2 PGC-1/AS et production d'H₂O₂ de mitochondries hépatiques

		FOIE		
		Entraînement	Entraînement + PGC-1α/AS	PGC-1α/AS
Glutamate/ Malate	<i>Etat 2</i>	26,68 ± 1,66	26,06 ± 1,24	32,63 ± 3,00
	<i>Roténone</i>	39,00 ± 4,80	53,62 ± 4,51	67,65 ± 5,89 \$
	<i>AA</i>	78,28 ± 10,97	93,42 ± 4,27	99,55 ± 6,94
Succinate	<i>Etat 2</i>	135,23 ± 9,36	132,14 ± 4,95	139,39 ± 11,96
	<i>Roténone</i>	23,17 ± 3,70	24,13 ± 2,28	19,96 ± 2,49
	<i>AA</i>	58,92 ± 7,06	64,00 ± 3,34	65,93 ± 5,66
Glut/Mal/ Succinate	<i>Etat 2</i>	139,72 ± 7,65	133,22 ± 4,57	157,32 ± 11,15 \$
	<i>Roténone</i>	60,28 ± 6,88	66,68 ± 3,60	82,70 ± 6,42
	<i>AA</i>	98,83 ± 9,84	108,63 ± 5,47	130,08 ± 9,52
Palmitoyl-L- Carnitine	<i>Etat 2</i>	28,15 ± 1,34	38,48 ± 3,27 #	42,35 ± 3,96
	<i>Roténone</i>	21,34 ± 4,60	31,73 ± 4,12	33,03 ± 4,31
	<i>AA</i>	84,00 ± 9,28	99,14 ± 5,91	109,85 ± 9,50

Tableau 27 : Effet d'un entraînement en endurance sur la production de peroxyde d'hydrogène (pmol d'H₂O₂/min/mg de protéines) de mitochondries de muscle provenant de rats contrôles ou entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min.

Le protocole expérimental est similaire aux expériences précédentes. Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM avec n=10. # Différent du groupe entraîné, \$ Différent du groupe entraîné + PGC-1α/AS (p < 0.05).

L'injection d'un oligonucléotide antisens de PGC-1α (PGC-1α/AS) utilisée dans ce travail est associée à des différences de production d'H₂O₂ par les mitochondries hépatique (Tableau 27).

En présence de G/M, la production d'H₂O₂ est supérieure après ajout de roténone dans le groupe PGC-1/AS (+26 %, p < 0,05) par rapport au groupe Ent+PGC-1/AS (Tableau 27).

En présence de succinate, la production d'H₂O₂ est similaire quelques soient les inhibiteurs dans le groupe Ent+PGC-1/AS par rapport au groupe entraîné et dans le groupe PGC-1/AS par rapport au groupe Ent+PGC-1/AS (Tableau 27).

Lorsqu'on alimente la chaîne dans sa globalité, la production d'H₂O₂ est supérieure à l'état 2 en présence de G/M/S, dans le groupe PGC-1/AS (+18 %, p < 0,05) par rapport au groupe Ent+PGC-1/AS. En présence de PC, la respiration est supérieure dans le groupe Ent+PGC-1/AS (+37 %, p < 0,05) par rapport au groupe entraîné (Tableau 27).

4.2.3 Rapport ROS/JO₂ et traitement PGC-1 α /AS

ROS / JO₂ (état 2)	Foie			Muscle		
	Entraînement	Entraînement + PGC-1α/AS	PGC-1α/AS	Entraînement	Entraînement + PGC-1α/AS	PGC-1α/AS
Glutamate/Malate	2,73 ± 0,29	2,21 ± 0,15	2,86 ± 0,21	2,6 ± 0,36	2,2 ± 0,10	2,8 ± 0,17
Succinate	5,75 ± 0,54	4,92 ± 0,28	5,27 ± 0,33	21,9 ± 3,0	19,4 ± 1,38	17,4 ± 2,38
Glutamate/Malate/ Succinate	4,90 ± 0,30	4,08 ± 0,29 #	5,29 ± 0,26 \$	18,6 ± 3,11	16,3 ± 1,91	14,1 ± 1,09
Palmitoyl-L-Carnitine	2,29 ± 0,25	2,25 ± 0,20	2,87 ± 0,24	1,9 ± 0,24	1,9 ± 0,12	1,8 ± 0,19

Tableau 28 : Effet d'un entraînement en endurance sur le rapport entre la production de peroxyde d'hydrogène (pmol d'H₂O₂/min/mg prot) et la consommation d'oxygène (nmol d'O/min/mg prot) à l'état 2 de mitochondries de foie et de muscle provenant de rats entraînés sur tapis roulant incliné à 10% pendant 6 semaines, 5 jours/semaine, 60 min/jour à 25m/min, de rats entraînés et traités à l'antisens de PGC-1 α et de rats traités à l'antisens de PGC-1 α uniquement.

Le protocole expérimental est similaire aux expériences précédentes. Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM avec n=10. # Différent du groupe entraîné, \$ Différent du groupe entraîné + PGC-1 α /AS (p < 0,05)

Le rapport de la production d'H₂O₂ sur la consommation d'oxygène (ROS/JO₂) présente des variations uniquement au niveau hépatique (Tableau 28). Le rapport ROS/JO₂ est inférieur dans le groupe Ent+PGC-1/AS (-17 %, p < 0,05) par rapport au groupe entraîné et supérieur dans le groupe PGC-1/AS (+30 %, p < 0,05) par rapport au groupe Ent+PGC-1/AS (Tableau 28).

4.2.4 Contenu protéique mitochondrial et traitement PGC-1 α /AS

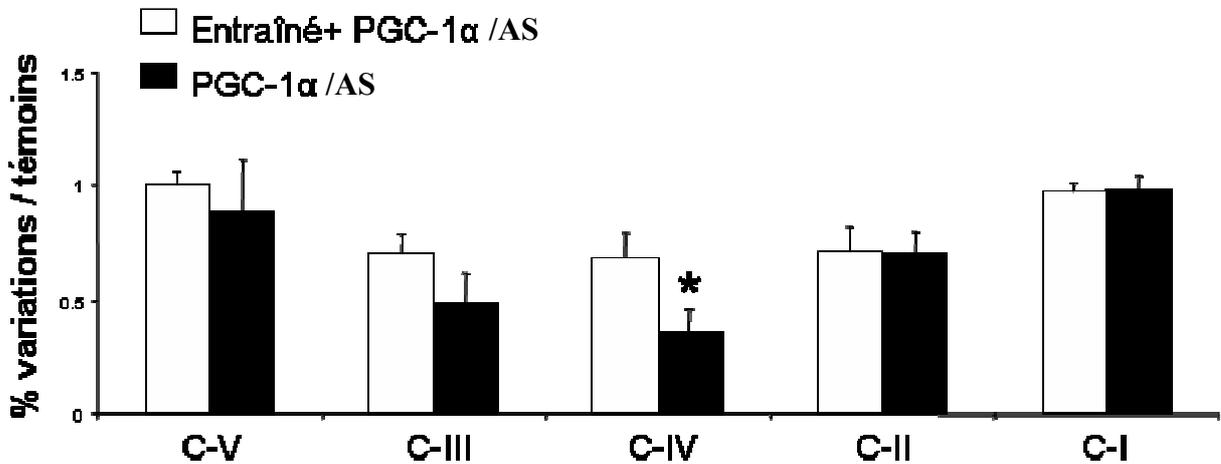


Figure 54 : Effet d'un entraînement en endurance sur le contenu protéique en complexes V, III, IV, II et I de la chaîne respiratoire mitochondriale mesuré sur mitochondries musculaires de rats entraînés et traités à l'antisens de PGC-1 α et de rats traités à l'antisens de PGC-1 α uniquement.

Le contenu protéique en complexes de la chaîne respiratoire a été évalué par Western Blot avec un cocktail d'anticorps anti-OXPHOS sur des mitochondries de quadriceps. * Différent du groupe contrôle ($p < 0,05$).

Le contenu protéique en complexes I, II, III et V de la chaîne respiratoire de mitochondries musculaires n'est pas significativement différent dans le groupe PGC-1/AS par rapport au groupe Ent+PGC-1/AS (Figure 54). Le contenu en complexe IV est significativement inférieur (-47%, $p < 0,05$) dans le groupe PGC-1/AS par rapport au groupe Ent+PGC-1/AS (Figure 54).

4.3 Discussion

Dans cette étude nous avons souhaité mettre en valeur l'importance de la voie de signalisation PGC-1 α en réponse à l'entraînement en endurance. Après un contrôle de notre traitement aux oligonucéotides antisens de PGC-1 α réalisé par injection intra-péritonéale sur l'expression de la protéine, nous avons mesuré les effets de l'inhibition de la traduction de PGC-1 α sur la densité mitochondriale tissulaire et enfin sur les adaptations fonctionnelles de la mitochondrie.

Nous avons pu mettre en évidence dans la deuxième partie de notre travail que l'entraînement en endurance favorisait un meilleur couplage respiratoire des mitochondries

musculaires à partir de substrats lipidiques (Tableau 17). De plus, nous avons pu observer une adaptation spécifique au niveau hépatique avec un couplage respiratoire augmenté à partir de substrat du complexe I (Tableau 18). Dans cette dernière partie nous avons voulu étudier l'importance du coactivateur transcriptionnel PGC-1 α dans les mécanismes d'adaptations mitochondriales liés à l'entraînement.

Respiration mitochondriale, entraînement et rôle de PGC-1

Alors que nous avons pu observer que l'entraînement induisait une augmentation du couplage mitochondrial lors de l'utilisation des acides gras, nous observons que cette adaptation est partiellement perdue en présence de l'oligonucléotide antisens de PGC-1 α . Il est donc possible d'envisager un rôle de ce coactivateur transcriptionnel dans la régulation de ce mécanisme particulier lié à l'entraînement, attribué principalement à une adaptation au niveau de la chaîne respiratoire.

En alimentant les complexes I et II de la chaîne respiratoire de façon isolée, on observe dans le groupe Ent+PGC-1/AS une augmentation des mécanismes de *leak* mise en évidence par l'inhibition des ATPase. Dans cette condition d'état 4, la respiration est augmentée dans le groupe Ent+PGC-1/AS par rapport au groupe entraîné. L'absence de PGC-1 α semble jouer sur la perméabilité membranaire à la suite d'un entraînement. L'exercice chronique est connu pour augmenter le contenu en UCP dans le tissu musculaire (Zhou et coll., 2000). Il semblerait que cet effet de l'exercice passe principalement par une activation rapide de la voie de l'AMPK. Il semblerait donc qu'en absence de PGC-1 α , l'activité chronique suractive la voie AMPK qui serait à l'origine d'une augmentation de l'expression d'UCP et donc d'une diminution de la perméabilité membranaire mise en avant par nos mesures et mériterait d'être mesurée dans le futur.

PGC-1 α joue un rôle important dans le métabolisme oxydatif musculaire. Il régule l'expression des protéines découplantes, augmente la biogenèse mitochondriale et l'expression de certains composants de la chaîne respiratoire comme le cytochrome c, la sous unité β de l'ATP synthase et la cytochrome oxydase (Wu et coll., 1999). Ces données renforcent le lien étroit existant entre l'AMPK et PGC-1 α .

Lors de l'alimentation de la chaîne respiratoire dans sa globalité, en forçant la chaîne avec une association saturante de substrats des complexe I et II, on observe que la respiration en condition découplée, lorsque la perméabilité de la membrane mitochondriale interne aux

protons est augmentée de façon artificielle, est inférieure dans le groupe Ent+PGC-1/AS par rapport au groupe entraîné (Tableau 24). La respiration est donc diminuée dans le groupe Ent+PGC-1/AS rapport au groupe entraîné. Tout se passe comme si l'effet découplant était diminué dans le groupe Ent+PGC-1 α /AS. Cela peut provenir d'un rapport NADH/NAD, estimant l'état redox matriciel, supérieur dans le groupe Ent+PGC-1 α /AS. Nous pouvons nous apercevoir que ce n'est pas l'entrée des équivalents réduits au niveau des deux premiers complexes qui est limitante dans le groupe Ent+PGC-1/AS par rapport au groupe entraîné car dans la condition phosphorylante à des vitesses de respiration similaires, nous n'apercevons pas de différence entre ces groupes. Il semble donc qu'en absence de phosphorylation due à la présence d'oligomycine ce soit, dans ces conditions maximales, une modification du fonctionnement de la cytochrome oxydase qui explique ces variations de respiration.

Au niveau des mitochondries hépatiques, la respiration est inchangée aux états 2 et 3 en présence de substrats alimentant les complexe I et II de façon isolée ou simultanée (Tableau 25). L'absence de PGC-1 α n'induit pas de modification. Cependant, la respiration est significativement plus faible dans le groupe PGC-1/AS par rapport au groupe Ent+PGC-1/AS en présence d'acide gras. Il semble que l'entrée des équivalents réduits dans la chaîne respiratoire soit limitée par l'absence de PGC-1 α .

Production d'H₂O₂ mitochondriale et exercice chronique

L'absence de PGC-1 α au cours du processus d'entraînement conduit à une augmentation de la production de ROS en présence de substrats alimentant le complexe I, amplifiée par la présence de roténone. Il semblerait donc qu'au niveau musculaire, PGC-1 α soit un régulateur de la production de ROS induite par la NADH déshydrogénase. Cependant dans ces conditions d'inhibition de PGC-1 α , l'entraînement maintient son action particulière sur le complexe III.

On peut observer qu'en présence de G/M et de roténone, la production de ROS est significativement supérieure dans le groupe Ent+PGC-1 α /AS par rapport au groupe PGC-1/AS (Tableau 26). Il semblerait que l'entraînement favorise l'état de réduction du complexe I en l'absence de PGC-1 α . On remarque que c'est réellement les conditions d'entraînement qui potentialise cet état particulier en comparant le groupe Ent+PGC-1 α /AS et PGC-1/AS.

Le potentiel de membrane ($\Delta\Psi$) joue un rôle important dans les mécanismes de production de ROS (Korshunov et coll., 1998). Il est possible d'envisager qu'en absence de PGC-1 α lors d'un protocole d'entraînement, l'expression des UCP augmentée dans les

conditions d'entraînement, se voit diminuée lorsque le facteur de transcription PGC-1 α est inhibé.

Le coactivateur transcriptionnel PGC-1 α est considéré comme un des principaux, voir même le principal, régulateur de la biogenèse mitochondriale en réponse à un stimulus extérieur comme peut l'être l'activité physique (Hood et Saleem, 2007, Lin et coll., 2005). On pourrait penser que si la production de ROS est proportionnelle à l'augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire stimulée par la protéine PGC-1 α , alors cette dernière devrait induire une augmentation de la production de ROS. Il est possible d'avancer deux pistes qui montrent que cela n'est pas complètement vrai. Nous avons pu voir que l'activité physique qui induit une biogenèse mitochondriale (Figure 53) n'est pas associée à de nombreux dégâts cellulaires (Tableau 22) liés à une surproduction éventuelle de radicaux libres. Deuxièmement, il a été montré que PGC-1 α augmentait l'expression d'une des principales enzymes antioxydantes de la mitochondrie : la superoxyde dismutase (St-Pierre et coll., 2003, Valle et coll., 2005). Il est donc étonnant de s'apercevoir que ce coactivateur augmente l'expression de la majorité des protéines mitochondriales, étant pour certaines d'entre elles des sources majeures de ROS, et que dans le même temps il augmente l'expression des systèmes de défenses. Récemment, malgré ces données ambiguës, St Pierre et coll. ont montré que PGC-1 α apparaissait plutôt comme ayant un rôle puissant « d'antioxydant » (St-Pierre et coll., 2006).

PGC-1 α pourrait servir de régulateur, capable à la fois d'améliorer la fourniture énergétique en réponse à des contraintes environnementales comme l'activité physique répétée et protéger dans le même temps des effets toxiques liés à l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène initiée par ces mécanismes de production d'énergie.

Au niveau musculaire on observe que la production de ROS dans le groupe Ent+PGC-1 α est augmentée par rapport au groupe entraîné dans toutes les conditions où le complexe I est alimenté (Tableau 26). En effet en présence de succinate, l'absence de PGC-1 α n'induit aucune modification d'adaptation. En n'observant aucune modification de production de ROS augmentée via le flux inverse, il semblerait donc que PGC-1 α n'est pas une action sur l'état de réduction du complexe I mais plutôt sur sa conformation ou son enchâssement dans la membrane phospholipidique. En présence d'acides gras, nous pouvons observer que cette tendance s'étend au complexe III. Ceci pourrait nous amener à évoquer un rôle probable de PGC-1 α dans l'arrangement supramoléculaire de la chaîne respiratoire.

Dans le foie, nous ne voyons apparaître aucune modification de production radicalaire en présence de substrat du complexe II, alors que la production de ROS est modifiée dans

toutes les conditions où le complexe I est alimenté (Tableau 27). Nous pouvons constater que la production est inchangée entre les groupes Ent+PGC-1/AS et entraîné alors qu'elle est augmentée dans le groupe PGC-1/AS par rapport au groupe Ent+PGC-1/AS. Il apparaît dans le foie que l'entraînement est susceptible de surpasser les effets de l'inhibition de PGC-1 α pour le contrôle de la production radicalaire.

Alors qu'en absence de PGC-1 α dans le muscle, l'entraînement semble dérégler les processus de production de ROS « contrôlés » par le statut antioxydant mitochondrial, il maintient ou rétablit ce contrôle au niveau hépatique. Ceci confirme les effets tissus spécifiques de PGC-1 α sur la biogenèse mitochondriale et le contrôle fonctionnel de l'oxydation phosphorylante (Irrcher et coll., 2003b).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Notre travail s'est basé sur une revue de littérature décrivant les mécanismes pluriels qui influencent l'évolution de l'homéostasie redox, faisant ressortir l'importance du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale dans cette balance et les effets variés de l'activité physique sur les paramètres courants de dommages et défenses.

Ces travaux de thèse avaient plusieurs objectifs. Le premier était de définir si l'exercice modéré réalisé en aigu provoquait des adaptations mitochondriales susceptibles d'induire une augmentation de la production de ROS au niveau des tissus musculaires et hépatiques. Dans cette première étude, nous avons voulu tester si ces adaptations évoluaient au décours de l'exercice. Le second objectif était de déterminer si l'activité physique chronique induisait, outre une adaptation quantitative du contenu mitochondrial au niveau tissulaire, une adaptation fonctionnelle de la chaîne respiratoire. Enfin, la troisième partie de travail était de préciser l'importance du coactivateur transcriptionnel PGC-1 α dans le processus de biogenèse mitochondriale et de définir l'impact de son inhibition sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire, par l'utilisation d'oligonucléotides antisens.

La première étude nous a permis de définir qu'un exercice unique modéré (~75% VO_{2max}) induisait des adaptations fonctionnelles de la chaîne respiratoire à la fois au niveau musculaire et hépatique. Il apparaît une augmentation de la production de ROS qui est contrôlée par un contenu en antioxydant (GSH) qui ne se voit pas affecté par cette augmentation de production. L'étude mécanistique des sites de productions, isolés par des substrats et inhibiteurs spécifiques, fait ressortir des effets différents de l'exercice selon les populations mitochondriales. Il apparaît que l'exercice influence majoritairement la production de ROS au niveau du complexe III pour le muscle et du complexe I pour le foie. Nous avons pu relever que cette production radicalaire persistait dans le temps avec des valeurs maintenues supérieures aux valeurs contrôles 2h après la fin de l'exercice dans le muscle ou n'apparaissant qu'après une période de 2h de récupération dans le foie. Cette persistance de production d'H₂O₂, considérée comme second messager dans de nombreux processus de signalisation, nous est alors apparue comme une hypothèse probable dans la régulation de la biogenèse mitochondriale en adaptation à un exercice répété.

La seconde partie de notre étude nous a permis de tester l'effet d'un entraînement en endurance modéré ($\sim 75\%$ VO_{2max}) de six semaines sur le fonctionnement mitochondrial. Nous avons pu observer que l'activité de citrate synthase (CS) au niveau tissulaire, indice d'une augmentation en contenu mitochondrial, était augmentée dans le muscle. De façon plus surprenante et surtout moins attendue, l'activité CS est aussi augmentée dans le tissu hépatique. De plus, nous avons observé suite à l'entraînement des modifications spécifiques de cette activité CS exprimée par unité de protéines mitochondriales hépatiques. Concernant les adaptations qualitatives, nous avons pu observer que la mesure de consommation d'oxygène révèle des adaptations mitochondriales tissus spécifiques. On observe un couplage mitochondrial amélioré dans le muscle lors de l'utilisation des acides gras et en présence de substrats alimentant totalement ou partiellement le complexe I dans le foie. La mesure de la production de ROS suite à l'entraînement confirme les résultats mis en avant lors de l'exercice unique avec des modifications principales de la production engendrée par le complexe III dans le muscle et le complexe I dans le foie. Les résultats de cet ensemble d'adaptations quantitatives et qualitatives induites par l'activité physique régulière nous ont encouragés à définir un régulateur commun. Nous avons donc émis l'hypothèse que le coactivateur transcriptionnel PGC-1 α , considéré comme la clé de voute des processus d'adaptation de la densité mitochondriale, pouvait influencer les paramètres observés à la suite de l'entraînement.

Dans une dernière partie, nous avons pu observer l'effet probant de l'utilisation d'oligonucléotide injecté par voie intra-péritonéale en révélant au niveau musculaire une chute d'expression de 70% de la protéine PGC-1 α . La mesure de densité mitochondriale, augmenté par l'entraînement en endurance, n'est pas influencée dans le muscle par la réduction importante de PGC-1 α induite par notre traitement. Cependant au niveau hépatique l'entraînement en endurance devient incapable d'induire une biogenèse en absence majeure de ce coactivateur transcriptionnel. En parallèle, nous observons en absence de PGC-1 α une perturbation importante du fonctionnement mitochondrial régulé par l'entraînement. Cela est révélé principalement lors de l'utilisation de substrat du complexe I que ce soit au niveau de la consommation d'oxygène ou de la production de ROS.

La possibilité pour PGC-1 α d'augmenter dans de nombreux tissus l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale tout en stimulant un large programme antioxydant à la suite d'un entraînement en endurance fait de ce coactivateur une protéine intéressante à étudier. Son implication probable dans le contrôle des dommages oxydants associés à des

dysfonctions mitochondriales, tel qu'on peut le voir dans les pathologies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson ou d'Alzheimer, fait de ce facteur hautement inductible par des stimuli environnementaux, une cible thérapeutique à explorer. Pouvant être initié par un programme d'entraînement en endurance modéré, cette voie renforce l'intérêt de l'activité physique régulière dans de nombreuses pathologies pour lesquelles la sédentarité ne peut faire qu'accélérer la dégénérescence.

PERSPECTIVES

Ces travaux de thèse ont ouvert de nombreuses perspectives d'investigation sur la régulation du stress oxydant en condition physiologique. Les paramètres que nous avons mesurés suite à une activité physique modérée n'ont pas eu la prétention de couvrir la totalité du champ complexe du stress oxydant mais amènent des pistes pour la compréhension des mécanismes d'adaptations de la production de ROS par la chaîne respiratoire mitochondriale.

Les premières perspectives sur ce travail seraient d'ordre complémentaire. En effet nous pourrions enrichir la gamme de paramètres évalués pour établir un « profil redox » complet de nos rats. Celui-ci devrait pouvoir renseigner du niveau général des diverses défenses antioxydantes, comprenant les activités SOD, GPx et CAT mais aussi le contenu en glutathion. Il devrait permettre d'estimer les dommages généraux pouvant être mesurés rapidement dans un premier temps sur des échantillons de sérum et comparer ensuite à des marqueurs tissulaires et mitochondriaux. Sur ce point il pourrait être intéressant d'évaluer les dégâts oxydants au sein même de la mitochondrie. En effet, à la suite de ces travaux il est possible d'imaginer que le stress oxydant observé par la mesure des dommages tissulaires n'est pas le réel miroir des dégâts mitochondriaux. Il pourrait ne refléter que la dégradation de tissus endommagés et rajouter une fonction bénéfique à cette augmentation radicalaire à l'exercice. Après avoir évoqué dans la discussion le paramètre de perméabilité membranaire dans la régulation du stress oxydant, il serait primordial de pouvoir associer à nos mesures la mesure du potentiel de membrane, de composition membranaire en cardiolipine, du contenu en UCP et de rapport P/O. De plus, il serait intéressant de compléter les informations observées sur le contenu protéique en complexe de la chaîne respiratoire au niveau musculaire et hépatique et de confirmer l'influence de notre traitement aux oligonucléotides sur les transcrits de PGC-1 α .

Comme pour la mesure de la production de ROS, l'ensemble des paramètres de défenses et dommages devrait se faire sous la forme d'une cinétique d'apparition et de récupération permettant de mieux cerner les conséquences à court, moyen et pourquoi pas long terme de l'activité physique sur l'homéostasie redox. Dans cette perspective, nous pourrions envisager de laisser vieillir des rats ayant subi une activité physique régulière et d'observer les effets de l'activité physique sur le vieillissement à posteriori contrairement aux études contemporaines qui étudient les effets de l'activité physique sur le sujet âgé. Il serait aussi intéressant d'évaluer l'effet d'un exercice modéré sur des rats préalablement entraînés.

Ainsi à partir des conclusions obtenues, sur les effets de l'activité physique concernant les adaptations qualitatives des sites de production de ROS, spécifique aux tissus étudiés, nous pourrions utiliser notre modèle d'exercice modérée pour traiter différentes conditions expérimentales. Il serait possible d'investiguer les effets de l'activité modérée sur des rats exprimant une des nombreuses pathologies dépendant ou impliquant un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (par ex : diabète, parkinson).

A partir de l'observation d'une participation des ROS dans la voie de signalisation de PGC-1 α , il serait évidemment intéressant d'appréhender les interactions de ce facteur de transcription avec l'ensemble de la cascade d'intermédiaires en amont et en aval mesurée suite à notre protocole d'exercice. Dans un complément d'étude, il serait bon d'envisager de mesurer le niveau d'activation de la voie AMPK dans un groupe de rats entraînés et traités avec l'oligonucléotide PGC-1 α /AS.

De plus l'utilisation d'une complémentation en antioxydant (type NAC) conjointement à l'entraînement pourrait nous permettre de visualiser si cela perturbe la production basale d'H₂O₂ déjà tolérée par les défenses intrinsèques. Si une perturbation est observée sur la production de radicaux libres, il faudrait regarder alors si la biogenèse est affectée.

Il pourrait être intéressant d'ajouter au protocole d'activité physique une étude la restriction alimentaire de façon à observer si les deux conditions simultanées auraient des effets cumulatifs sur l'augmentation des défenses antioxydantes et un prolongement de la durée de vie ou si au contraire le cumul de modifications importantes de l'homéostasie serait à la source de nombreux dégâts.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. **Abate C and Curran T.** Encounters with Fos and Jun on the road to AP-1. *Semin Cancer Biol* 1: 19-26, 1990.
2. **Akerboom TP and Sies H.** Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 77: 373-382, 1981.
3. **Alessio HM and Goldfarb AH.** Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. *J Appl Physiol* 64: 1333-1336, 1988.
4. **Alessio HM, Goldfarb AH, and Cutler RG.** MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. *Am J Physiol* 255: C874-877, 1988.
5. **Ali MA, Yasui F, Matsugo S, and Konishi T.** The lactate-dependent enhancement of hydroxyl radical generation by the Fenton reaction. *Free Radic Res* 32: 429-438, 2000.
6. **Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, and Young IG.** Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465, 1981.
7. **Antunes F and Cadenas E.** Cellular titration of apoptosis with steady state concentrations of H₂O₂: submicromolar levels of H₂O₂ induce apoptosis through Fenton chemistry independent of the cellular thiol state. *Free Radic Biol Med* 30: 1008-1018, 2001.
8. **Astrand PO.** Age, physical fitness and health. *Sb Lek* 95: 59-63, 1994.
9. **Astrand PO, Hultman E, Juhlin-Dannfelt A, and Reynolds G.** Disposal of lactate during and after strenuous exercise in humans. *J Appl Physiol* 61: 338-343, 1986.
10. **Astrand PO and Ryhming I.** A nomogram for calculation of aerobic capacity (physical fitness) from pulse rate during sub-maximal work. *J Appl Physiol* 7: 218-221, 1954.
11. **Atherton PJ, Babraj J, Smith K, Singh J, Rennie MJ, and Wackerhage H.** Selective activation of AMPK-PGC-1 α or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *Faseb J* 19: 786-788, 2005.
12. **Aydin C, Ince E, Koparan S, Cangul IT, Naziroglu M, and Ak F.** Protective effects of long term dietary restriction on swimming exercise-induced oxidative stress in the liver, heart and kidney of rat. *Cell Biochem Funct* 25: 129-137, 2007.
13. **Baar K.** Involvement of PPAR gamma co-activator-1, nuclear respiratory factors 1 and 2, and PPAR alpha in the adaptive response to endurance exercise. *Proc Nutr Soc* 63: 269-273, 2004.
14. **Balaban RS, Nemoto S, and Finkel T.** Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120: 483-495, 2005.
15. **Banerjee AK, Mandal A, * Chanda D, and S. C.** Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Molecular and Cellular Biochemistry* 253: 307-312, 2003.
16. **Barja G.** Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr* 31: 347-366, 1999.
17. **Barja G.** The quantitative measurement of H₂O₂ generation in isolated mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 34: 227-233, 2002.
18. **Barouki R and Morel Y.** [Biological targets of oxidative stress]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu*: 65-73, 2001.
19. **Barrett WC, DeGnore JP, Konig S, Fales HM, Keng YF, Zhang ZY, Yim MB, and Chock PB.** Regulation of PTP1B via glutathionylation of the active site cysteine 215. *Biochemistry* 38: 6699-6705, 1999.
20. **Batandier C, Fontaine E, Keriell C, and Leverve XM.** Determination of mitochondrial reactive oxygen species: methodological aspects. *J Cell Mol Med* 6: 175-187, 2002.
21. **Beckman KB and Ames BN.** The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78: 547-581, 1998.
22. **Bejma J and Ji LL.** Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 87: 465-470, 1999.
23. **Bejma J, Ramires P, and Ji LL.** Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: differential effects in the myocardium and liver. *Acta Physiol Scand* 169: 343-351, 2000.
24. **Berchtold MW, Brinkmeier H, and Muntener M.** Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev* 80: 1215-1265, 2000.
25. **Bergeron R, Ren JM, Cadman KS, Moore IK, Perret P, Pypaert M, Young LH, Semenkovich CF, and Shulman GI.** Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E1340-1346, 2001.
26. **Boekema EJ and Braun HP.** Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem* 282: 1-4, 2007.
27. **Bohnert M, Pfanner N, and van der Laan M.** A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins. *FEBS Lett* 581: 2802-2810, 2007.

28. **Boveris A and Chance B.** The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134: 707-716, 1973.
29. **Boveris A, Costa LE, Cadenas E, and Poderoso JJ.** Regulation of mitochondrial respiration by adenosine diphosphate, oxygen, and nitric oxide. *Methods Enzymol* 301: 188-198, 1999.
30. **Boveris A, Oshino N, and Chance B.** The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128: 617-630, 1972.
31. **Brady PS, Brady LJ, and Ullrey DE.** Selenium, vitamin E and the response to swimming stress in the rat. *J Nutr* 109: 1103-1109, 1979.
32. **Brady PS, Shelle JE, and Ullrey DE.** Rapid changes in equine erythrocyte glutathione reductase with exercise. *Am J Vet Res* 38: 1045-1047, 1977.
33. **Brand MD.** The proton leak across the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta* 1018: 128-133, 1990.
34. **Brand MD, Buckingham JA, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Murphy MP, Pakay JL, Talbot DA, and Echtay KS.** Mitochondrial superoxide and aging: uncoupling-protein activity and superoxide production. *Biochem Soc Symp*: 203-213, 2004.
35. **Brand MD and Murphy MP.** Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells. *Biol Rev Camb Philos Soc* 62: 141-193, 1987.
36. **Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, and Sheu SS.** Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C817-833, 2004.
37. **Brooks GA and White TP.** Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol* 45: 1009-1015, 1978.
38. **Bulaj G, Kortemme T, and Goldenberg DP.** Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry* 37: 8965-8972, 1998.
39. **Burke TM and Wolin MS.** Hydrogen peroxide elicits pulmonary arterial relaxation and guanylate cyclase activation. *Am J Physiol* 252: H721-732, 1987.
40. **Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, and Sauvaigo S.** Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res* 424: 9-21, 1999.
41. **Cai H.** Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res* 68: 26-36, 2005.
42. **Canton M, Luvisetto S, Schmehl I, and Azzone GF.** The nature of mitochondrial respiration and discrimination between membrane and pump properties. *Biochem J* 310 (Pt 2): 477-481, 1995.
43. **Cardoso SM, Proenca MT, Santos S, Santana I, and Oliveira CR.** Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets. *Neurobiol Aging* 25: 105-110, 2004.
44. **Chan DC.** Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 79-99, 2006.
45. **Chance B and Hollunger G.** The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria. I. General properties and nature of the products of succinate-linked reduction of pyridine nucleotide. *J Biol Chem* 236: 1534-1543, 1961.
46. **Chance B, Sies H, and Boveris A.** Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605, 1979.
47. **Chance B and Williams GR.** The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* 17: 65-134, 1956.
48. **Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, and Lesnefsky EJ.** Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278: 36027-36031, 2003.
49. **Choi MH, Lee IK, Kim GW, Kim BU, Han YH, Yu DY, Park HS, Kim KY, Lee JS, Choi C, Bae YS, Lee BI, Rhee SG, and Kang SW.** Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature* 435: 347-353, 2005.
50. **Clapham DE.** Calcium signaling. *Cell* 80: 259-268, 1995.
51. **Commoner B, Townsend J, and Pake GE.** Free radicals in biological materials. *Nature* 174: 689-691, 1954.
52. **Criswell D, Powers S, Dodd S, Lawler J, Edwards W, Renshler K, and Grinton S.** High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med Sci Sports Exerc* 25: 1135-1140, 1993.
53. **Croset M, Rajas F, Zitoun C, Hurot JM, Montano S, and Mithieux G.** Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes* 50: 740-746, 2001.
54. **Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, and Packer L.** Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 107: 1198-1205, 1982.
55. **De Souza CT, Araujo EP, Prada PO, Saad MJ, Boschero AC, and Velloso LA.** Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice. *Diabetologia* 48: 1860-1871, 2005.
56. **De Souza CT, Gasparetti AL, Pereira-da-Silva M, Araujo EP, Carneiro EM, Carvalheira JB, Saad MJ, Boschero AC, Carneiro EM, and Velloso LA.** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-

- dependent uncoupling protein-2 expression in pancreatic islets of rats: a novel pathway for neural control of insulin secretion. *Diabetologia* 46: 1522-1531, 2003.
57. **del Arco A, Morcillo J, Martinez-Morales JR, Galian C, Martos V, Bovolenta P, and Satrustegui J.** Expression of the aspartate/glutamate mitochondrial carriers aralar1 and citrin during development and in adult rat tissues. *Eur J Biochem* 269: 3313-3320, 2002.
 58. **Delbart C.** *Les mitochondries : biologie et incidences physiologiques*, 2001.
 59. **Delp MD and Duan C.** Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl Physiol* 80: 261-270, 1996.
 60. **Denu JM and Tanner KG.** Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* 37: 5633-5642, 1998.
 61. **Devin A, Guerin B, and Rigoulet M.** Control of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria: effect of ionic media. *Biochim Biophys Acta* 1319: 293-300, 1997.
 62. **Di Giovanni S, Mirabella M, Papacci M, Odoardi F, Silvestri G, and Servidei S.** Apoptosis and ROS detoxification enzymes correlate with cytochrome c oxidase deficiency in mitochondrial encephalomyopathies. *Mol Cell Neurosci* 17: 696-705, 2001.
 63. **Di Meo S and Venditti P.** Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept* 10: 125-140, 2001.
 64. **Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, and Tappel AL.** Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol* 45: 927-932, 1978.
 65. **Donovan CM and Sumida KD.** Training enhanced hepatic gluconeogenesis: the importance for glucose homeostasis during exercise. *Med Sci Sports Exerc* 29: 628-634, 1997.
 66. **Droge W.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95, 2002.
 67. **Duchen MR.** Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med* 25: 365-451, 2004.
 68. **Dudkina NV, Heinemeyer J, Sunderhaus S, Boekema EJ, and Braun HP.** Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane. *Trends Plant Sci* 11: 232-240, 2006.
 69. **Dumas JF, Roussel D, Simard G, Douay O, Foussard F, Malthiery Y, and Ritz P.** Food restriction affects energy metabolism in rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1670: 126-131, 2004.
 70. **Dumont A, Hehner SP, Hofmann TG, Ueffing M, Droge W, and Schmitz ML.** Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kappaB. *Oncogene* 18: 747-757, 1999.
 71. **Dunn SE, Burns JL, and Michel RN.** Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. *J Biol Chem* 274: 21908-21912, 1999.
 72. **Duthie GG, Robertson JD, Maughan RJ, and Morrice PC.** Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. *Arch Biochem Biophys* 282: 78-83, 1990.
 73. **Ebal E, Cavalie H, Michaux O, and Lac G.** Effect of a moderate exercise on the regulatory hormones of food intake in rats. *Appetite* 49: 521-524, 2007.
 74. **Echtay KS.** Mitochondrial uncoupling proteins-What is their physiological role? *Free Radic Biol Med* 43: 1351-1371, 2007.
 75. **Echtay KS, Esteves TC, Pakay JL, Jekabsons MB, Lambert AJ, Portero-Otin M, Pamplona R, Vidal-Puig AJ, Wang S, Roebuck SJ, and Brand MD.** A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *Embo J* 22: 4103-4110, 2003.
 76. **Ellman GL.** Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-77, 1959.
 77. **Fandrey J, Frede S, and Jelkmann W.** Role of hydrogen peroxide in hypoxia-induced erythropoietin production. *Biochem J* 303 (Pt 2): 507-510, 1994.
 78. **Fernstrom M, Tonkonogi M, and Sahlin K.** Effects of acute and chronic endurance exercise on mitochondrial uncoupling in human skeletal muscle. *J Physiol* 554: 755-763, 2004.
 79. **Flohe L and Gunzler WA.** Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105: 114-121, 1984.
 80. **Fontaine EM, Devin A, Rigoulet M, and Leverve XM.** The yield of oxidative phosphorylation is controlled both by force and flux. *Biochem Biophys Res Commun* 232: 532-535, 1997.
 81. **Fontaine EM, Moussa M, Devin A, Garcia J, Ghisolfi J, Rigoulet M, and Leverve XM.** Effect of polyunsaturated fatty acids deficiency on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1276: 181-187, 1996.
 82. **Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD, Davies JM, and Dolan L.** Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442-446, 2003.
 83. **Freyssenet D, Irrcher I, Connor MK, Di Carlo M, and Hood DA.** Calcium-regulated changes in mitochondrial phenotype in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C1053-1061, 2004.
 84. **Fridovich I.** Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64: 97-112, 1995.

85. **Gabaldon T, Rainey D, and Huynen MA.** Tracing the evolution of a large protein complex in the eukaryotes, NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *J Mol Biol* 348: 857-870, 2005.
86. **Garait B.** *Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®.* Grenoble: Université Joseph Fourier, 2006.
87. **Genova ML, Bianchi C, and Lenaz G.** Supercomplex organization of the mitochondrial respiratory chain and the role of the Coenzyme Q pool: pathophysiological implications. *Biofactors* 25: 5-20, 2005.
88. **Genova ML, Ventura B, Giuliano G, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G, and Lenaz G.** The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Lett* 505: 364-368, 2001.
89. **Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, and Fenn WO.** Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* 119: 623-626, 1954.
90. **Ghanassia E, Brun JF, Mercier J, and Raynaud E.** Oxidative mechanisms at rest and during exercise. *Clin Chim Acta* 383: 1-20, 2007.
91. **Ghosh SK, Roychoudhury S, Kar S, Ghosh JJ, Chakraborti T, and Chakraborti S.** Protective role of anion channel blocker in lipid peroxidation caused by H₂O₂ in microsomes of bovine pulmonary arterial smooth muscle tissue. *Indian J Biochem Biophys* 33: 57-61, 1996.
92. **Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, and Pelicci PG.** Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 722-728, 2007.
93. **Gollnick PD and Ianuzzo CD.** Hormonal deficiencies and the metabolic adaptations of rats to training. *Am J Physiol* 223: 278-282, 1972.
94. **Gollnick PD and Saltin B.** Significance of skeletal muscle oxidative enzyme enhancement with endurance training. *Clin Physiol* 2: 1-12, 1982.
95. **Gonzalez C, Agapito MT, Rocher A, Gonzalez-Martin MC, Vega-Agapito V, Gomez-Nino A, Rigual R, Castaneda J, and Obeso A.** Chemoreception in the context of the general biology of ROS. *Respir Physiol Neurobiol* 157: 30-44, 2007.
96. **Gorski J, Oscai LB, and Palmer WK.** Hepatic lipid metabolism in exercise and training. *Med Sci Sports Exerc* 22: 213-221, 1990.
97. **Green DE and Tzagoloff A.** The mitochondrial electron transfer chain. *Arch Biochem Biophys* 116: 293-304, 1966.
98. **Green DE and Vande Zande H.** On the enzymic mechanism of oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 1064-1068, 1982.
99. **Groen AK, Wanders RJ, Westerhoff HV, van der Meer R, and Tager JM.** Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *J Biol Chem* 257: 2754-2757, 1982.
100. **Gross NJ, Getz GS, and Rabinowitz M.** Apparent turnover of mitochondrial deoxyribonucleic acid and mitochondrial phospholipids in the tissues of the rat. *J Biol Chem* 244: 1552-1562, 1969.
101. **Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, and Holbrook NJ.** Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 271: 4138-4142, 1996.
102. **Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, Simon MC, Hammerling U, and Schumacker PT.** Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab* 1: 401-408, 2005.
103. **Ha H, Hajek P, Bedwell DM, and Burrows PD.** A mitochondrial porin cDNA predicts the existence of multiple human porins. *J Biol Chem* 268: 12143-12149, 1993.
104. **Hackenbrock CR, Chazotte B, and Gupte SS.** The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr* 18: 331-368, 1986.
105. **Hackenbrock CR, Hochli M, and Chau RM.** Calorimetric and freeze fracture analysis of lipid phase transitions and lateral translational motion of intramembrane particles in mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta* 455: 466-484, 1976.
106. **Halliwell BaG, JMC.** *Free Radicals in Biology and Medicine:* Oxford University Press, 1999.
107. **Hansford RG, Hogue BA, and Mildaziene V.** Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr* 29: 89-95, 1997.
108. **Harman D.** Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300, 1956.
109. **Harman D.** The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal* 5: 557-561, 2003.
110. **Harman D.** Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci* 1067: 10-21, 2006.
111. **Hatefi Y.** The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* 54: 1015-1069, 1985.
112. **Herrero A and Barja G.** ADP-regulation of mitochondrial free radical production is different with complex I- or complex II-linked substrates: implications for the exercise paradox and brain hypermetabolism. *J Bioenerg Biomembr* 29: 241-249, 1997.

113. **Higuchi M, Cartier LJ, Chen M, and Holloszy JO.** Superoxide dismutase and catalase in skeletal muscle: adaptive response to exercise. *J Gerontol* 40: 281-286, 1985.
114. **Hogeboom GH and Schneider WC.** Biochemistry of cellular particles. *Annu Rev Biochem* 25: 201-224, 1956.
115. **Hollander J, Bejma J, Ookawara T, Ohno H, and Ji LL.** Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific effect of age. *Mech Ageing Dev* 116: 33-45, 2000.
116. **Holloszy JO.** Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* 242: 2278-2282, 1967.
117. **Holloszy JO and Booth FW.** Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu Rev Physiol* 38: 273-291, 1976.
118. **Holloszy JO and Coyle EF.** Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol* 56: 831-838, 1984.
119. **Honda HM, Korge P, and Weiss JN.** Mitochondria and ischemia/reperfusion injury. *Ann N Y Acad Sci* 1047: 248-258, 2005.
120. **Hong JH, Kim MJ, Park MR, Kwag OG, Lee IS, Byun BH, Lee SC, Lee KB, and Rhee SJ.** Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta* 340: 107-115, 2004.
121. **Hood DA.** Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 90: 1137-1157, 2001.
122. **Hood DA and Saleem A.** Exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17: 332-337, 2007.
123. **Hoppeler H, Luthi P, Claassen H, Weibel ER, and Howald H.** The ultrastructure of the normal human skeletal muscle. A morphometric analysis on untrained men, women and well-trained orienteers. *Pflugers Arch* 344: 217-232, 1973.
124. **Huang TT, Yasunami M, Carlson EJ, Gillespie AM, Reaume AG, Hoffman EK, Chan PH, Scott RW, and Epstein CJ.** Superoxide-mediated cytotoxicity in superoxide dismutase-deficient fetal fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 344: 424-432, 1997.
125. **Humphries KM, Yoo Y, and Szveda LI.** Inhibition of NADH-linked mitochondrial respiration by 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry* 37: 552-557, 1998.
126. **Irrcher I, Adhietty PJ, Joseph AM, Ljubic V, and Hood DA.** Regulation of mitochondrial biogenesis in muscle by endurance exercise. *Sports Med* 33: 783-793, 2003a.
127. **Irrcher I, Adhietty PJ, Sheehan T, Joseph AM, and Hood DA.** PPARgamma coactivator-1alpha expression during thyroid hormone- and contractile activity-induced mitochondrial adaptations. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C1669-1677, 2003b.
128. **Israel N, Gougerot-Pocidal MA, Aillet F, and Virelizier JL.** Redox status of cells influences constitutive or induced NF-kappa B translocation and HIV long terminal repeat activity in human T and monocytic cell lines. *J Immunol* 149: 3386-3393, 1992.
129. **Itoh H, Ohkuwa T, Yamamoto T, Sato Y, Miyamura M, and Naoi M.** Effects of endurance physical training on hydroxyl radical generation in rat tissues. *Life Sci* 63: 1921-1929, 1998.
130. **Jackson MJ, Edwards RH, and Symons MC.** Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 847: 185-190, 1985.
131. **Jenkins RR.** Exercise, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Int J Sport Nutr* 3: 356-375, 1993.
132. **Jenkins RR.** Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med* 5: 156-170, 1988.
133. **Ji LL.** Antioxidant signaling in skeletal muscle: A brief review. *Exp Gerontol* 42: 582-593, 2007.
134. **Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Steinhafel N, and Vina J.** Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. *Faseb J* 18: 1499-1506, 2004.
135. **Ji LL, Stratman FW, and Lardy HA.** Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. *Arch Biochem Biophys* 263: 150-160, 1988.
136. **Jones PL, Kucera G, Gordon H, and Boss JM.** Cloning and characterization of the murine manganous superoxide dismutase-encoding gene. *Gene* 153: 155-161, 1995.
137. **Joseph AM, Pilegaard H, Litvintsev A, Leick L, and Hood DA.** Control of gene expression and mitochondrial biogenesis in the muscular adaptation to endurance exercise. *Essays Biochem* 42: 13-29, 2006.
138. **Kang D and Hamasaki N.** Mitochondrial oxidative stress and mitochondrial DNA. *Clin Chem Lab Med* 41: 1281-1288, 2003.
139. **Kanter MM, Lesmes GR, Kaminsky LA, La Ham-Saeger J, and Nequin ND.** Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase changes following an eighty kilometer race. Relationship to lipid peroxidation. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 57: 60-63, 1988.
140. **Kayatekin BM, Gonenc S, Acikgoz O, Uysal N, and Dayi A.** Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver. *Eur J Appl Physiol* 87: 141-144, 2002.

141. **Kennedy EP and Lehninger AL.** The products of oxidation of fatty acids by isolated rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 185: 275-285, 1950.
142. **Khanna S, Atalay M, Laaksonen DE, Gul M, Roy S, and Sen CK.** Alpha-lipoic acid supplementation: tissue glutathione homeostasis at rest and after exercise. *J Appl Physiol* 86: 1191-1196, 1999.
143. **Kim YS.** Malonate metabolism: biochemistry, molecular biology, physiology, and industrial application. *J Biochem Mol Biol* 35: 443-451, 2002.
144. **Klingenberg M.** Mitochondria metabolite transport. *FEBS Lett* 6: 145-154, 1970.
145. **Korshunov SS, Korkina OV, Ruuge EK, Skulachev VP, and Starkov AA.** Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of O₂·- and H₂O₂ by mitochondria in the resting state. *FEBS Lett* 435: 215-218, 1998.
146. **Korshunov SS, Skulachev VP, and Starkov AA.** High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416: 15-18, 1997.
147. **Krauss S, Lascelles CV, Zammit VA, and Quant PA.** Flux control exerted by overt carnitine palmitoyltransferase over palmitoyl-CoA oxidation and ketogenesis is lower in suckling than in adult rats. *Biochem J* 319 (Pt 2): 427-433, 1996.
148. **Kussmaul L and Hirst J.** The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7607-7612, 2006.
149. **Kwong LK and Sohal RS.** Age-related changes in activities of mitochondrial electron transport complexes in various tissues of the mouse. *Arch Biochem Biophys* 373: 16-22, 2000.
150. **Kwong LK and Sohal RS.** Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 350: 118-126, 1998.
151. **Lambert AJ and Brand MD.** Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem J* 382: 511-517, 2004.
152. **Lambertucci RH, Levada-Pires AC, Rossoni LV, Curi R, and Pithon-Curi TC.** Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats. *Mech Ageing Dev* 128: 267-275, 2007.
153. **Lander HM.** An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *Faseb J* 11: 118-124, 1997.
154. **LaNoue KF and Tischler ME.** Electrogenic characteristics of the mitochondrial glutamate-aspartate antiporter. *J Biol Chem* 249: 7522-7528, 1974.
155. **Laughlin MH, Simpson T, Sexton WL, Brown OR, Smith JK, and Korthuis RJ.** Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training. *J Appl Physiol* 68: 2337-2343, 1990.
156. **Lawler JM, Powers SK, Visser T, Van Dijk H, Kordus MJ, and Ji LL.** Acute exercise and skeletal muscle antioxidant and metabolic enzymes: effects of fiber type and age. *Am J Physiol* 265: R1344-1350, 1993.
157. **Leeuwenburgh C, Fiebig R, Chandwaney R, and Ji LL.** Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am J Physiol* 267: R439-445, 1994.
158. **Leeuwenburgh C and Heinecke JW.** Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem* 8: 829-838, 2001.
159. **Leeuwenburgh C, Hollander J, Leichtweis S, Griffiths M, Gore M, and Ji LL.** Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am J Physiol* 272: R363-369, 1997.
160. **Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, and Kelly DP.** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest* 106: 847-856, 2000.
161. **Lehninger AL and Smith SW.** Efficiency of phosphorylation coupled to electron transport between dihydrodiphosphopyridine nucleotide and oxygen. *J Biol Chem* 181: 415-429, 1949.
162. **Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, Courtois M, Wozniak DF, Sambandam N, Bernal-Mizrachi C, Chen Z, Holloszy JO, Medeiros DM, Schmidt RE, Saffitz JE, Abel ED, Semenkovich CF, and Kelly DP.** PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol* 3: e101, 2005.
163. **Leverve X, Sibille B, Devin A, Piquet MA, Espie P, and Rigoulet M.** Oxidative phosphorylation in intact hepatocytes: quantitative characterization of the mechanisms of change in efficiency and cellular consequences. *Mol Cell Biochem* 184: 53-65, 1998.
164. **Leverve XM and Fontaine E.** Role of substrates in the regulation of mitochondrial function in situ. *IUBMB Life* 52: 221-229, 2001.
165. **Levine RL.** Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* 32: 790-796, 2002.

166. **Li J, Stouffs M, Serrander L, Banfi B, Bettiol E, Charnay Y, Steger K, Krause KH, and Jaconi ME.** The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: Role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. *Mol Biol Cell* 17: 3978-3988, 2006.
167. **Lin J, Handschin C, and Spiegelman BM.** Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 1: 361-370, 2005.
168. **Los M, Droge W, Stricker K, Baeuerle PA, and Schulze-Osthoff K.** Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions. *Eur J Immunol* 25: 159-165, 1995.
169. **Loschen G, Flohe L, and Chance B.** Respiratory chain linked H(2)O(2) production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett* 18: 261-264, 1971.
170. **Louet JF, Hayhurst G, Gonzalez FJ, Girard J, and Decaux JF.** The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4 alpha and cAMP-response element-binding protein (CREB). *J Biol Chem* 277: 37991-38000, 2002.
171. **Lummen P.** Complex I inhibitors as insecticides and acaricides. *Biochim Biophys Acta* 1364: 287-296, 1998.
172. **Macnee W and Rahman I.** Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 160: S58-65, 1999.
173. **Marcil M, Bourduas K, Ascah A, and Burelle Y.** Exercise training induces respiratory substrate-specific decrease in Ca²⁺-induced permeability transition pore opening in heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H1549-1557, 2006.
174. **Margaritis I, Tessier F, Richard MJ, and Marconnet P.** No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors. *Int J Sports Med* 18: 186-190, 1997.
175. **Marnett LJ.** Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. *IARC Sci Publ*: 17-27, 1999.
176. **Maughan RJ.** Exercise-induced muscle cramp: a prospective biochemical study in marathon runners. *J Sports Sci* 4: 31-34, 1986.
177. **McCord JM and Fridovich I.** Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055, 1969.
178. **McGarry JD and Foster DW.** Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem* 49: 395-420, 1980.
179. **Menzies RA and Gold PH.** The turnover of mitochondria in a variety of tissues of young adult and aged rats. *J Biol Chem* 246: 2425-2429, 1971.
180. **Meydani M, Evans W, Handelman G, Fielding RA, Meydani SN, Fiatarone MA, Blumberg JB, and Cannon JG.** Antioxidant response to exercise-induced oxidative stress and protection by vitamin E. *Ann N Y Acad Sci* 669: 363-364, 1992.
181. **Miller DM, Buettner GR, and Aust SD.** Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med* 8: 95-108, 1990.
182. **Mitchell P.** Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191: 144-148, 1961.
183. **Mittal CK and Murad F.** Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 4360-4364, 1977.
184. **Mogensen M, Sahlin K, Fernstrom M, Glintborg D, Vind BF, Beck-Nielsen H, and Hojlund K.** Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 56: 1592-1599, 2007.
185. **Molnar AM, Servais S, Guichardant M, Lagarde M, Macedo DV, Pereira-Da-Silva L, Sibille B, and Favier R.** Mitochondrial H₂O₂ production is reduced with acute and chronic eccentric exercise in rat skeletal muscle. *Antioxid Redox Signal* 8: 548-558, 2006.
186. **Muller FL, Liu Y, and Van Remmen H.** Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 279: 49064-49073, 2004.
187. **Murley JS, Kataoka Y, Hallahan DE, Roberts JC, and Grdina DJ.** Activation of NFkappaB and MnSOD gene expression by free radical scavengers in human microvascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 30: 1426-1439, 2001.
188. **Murray J, Taylor SW, Zhang B, Ghosh SS, and Capaldi RA.** Oxidative damage to mitochondrial complex I due to peroxynitrite: identification of reactive tyrosines by mass spectrometry. *J Biol Chem* 278: 37223-37230, 2003.
189. **Narath E, Skalicky M, and Viidik A.** Voluntary and forced exercise influence the survival and body composition of ageing male rats differently. *Exp Gerontol* 36: 1699-1711, 2001.
190. **Navarro A and Boveris A.** The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C670-686, 2007.
191. **Needham JG.** Curtis Gates Lloyd. *Science* 64: 569-570, 1926.
192. **Neuzil J, Gebicki JM, and Stocker R.** Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain-breaking antioxidants. *Biochem J* 293 (Pt 3): 601-606, 1993.

193. **New KJ, Krauss S, Elliott KR, and Quant PA.** Comparisons of flux control exerted by mitochondrial outer-membrane carnitine palmitoyltransferase over ketogenesis in hepatocytes and mitochondria isolated from suckling or adult rats. *Eur J Biochem* 259: 684-691, 1999.
194. **Niess AM and Simon P.** Response and adaptation of skeletal muscle to exercise--the role of reactive oxygen species. *Front Biosci* 12: 4826-4838, 2007.
195. **Nogueira V.** *Régulation de l'oxydation phosphorylante : importance physiologique de la modulation du couplage entre oxydation et phosphorylation*: Denis diderot, 2001.
196. **Nogueira V, Rigoulet M, Piquet MA, Devin A, Fontaine E, and Leverve XM.** Mitochondrial respiratory chain adjustment to cellular energy demand. *J Biol Chem* 276: 46104-46110, 2001.
197. **Nohl H, Gille L, and Staniek K.** Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem Pharmacol* 69: 719-723, 2005.
198. **Ogonovszky H, Sasvari M, Dosek A, Berkes I, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Goto S, and Radak Z.** The effects of moderate, strenuous, and overtraining on oxidative stress markers and DNA repair in rat liver. *Can J Appl Physiol* 30: 186-195, 2005.
199. **Oh-ishi S, Kizaki T, Nagasawa J, Izawa T, Komabayashi T, Nagata N, Suzuki K, Taniguchi N, and Ohno H.** Effects of endurance training on superoxide dismutase activity, content and mRNA expression in rat muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24: 326-332, 1997.
200. **Ohkawa H, Ohishi N, and Yagi K.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358, 1979.
201. **Ohnishi ST, Ohnishi T, Muranaka S, Fujita H, Kimura H, Uemura K, Yoshida K, and Utsumi K.** A possible site of superoxide generation in the complex I segment of rat heart mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 37: 1-15, 2005.
202. **Oliveira RL, Ueno M, de Souza CT, Pereira-da-Silva M, Gasparetti AL, Bezerra RM, Alberici LC, Vercesi AE, Saad MJ, and Velloso LA.** Cold-induced PGC-1 α expression modulates muscle glucose uptake through an insulin receptor/Akt-independent, AMPK-dependent pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E686-695, 2004.
203. **O'Neill CA, Stebbins CL, Bonigut S, Halliwell B, and Longhurst JC.** Production of hydroxyl radicals in contracting skeletal muscle of cats. *J Appl Physiol* 81: 1197-1206, 1996.
204. **Palade GE.** An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem* 1: 188-211, 1953.
205. **Palmieri L, Lasorsa FM, De Palma A, Palmieri F, Runswick MJ, and Walker JE.** Identification of the yeast ACR1 gene product as a succinate-fumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate. *FEBS Lett* 417: 114-118, 1997.
206. **Papa S, Guerrieri F, and Capitanio N.** A possible role of slips in cytochrome C oxidase in the antioxidant defense system of the cell. *Biosci Rep* 17: 23-31, 1997.
207. **Paul MH and Sperling E.** Cyclophorase system. XXIII. Correlation of cyclophorase activity and mitochondrial density in striated muscle. *Proc Soc Exp Biol Med* 79: 352-354, 1952.
208. **Pietrobon D, Luvisetto S, and Azzone GF.** Uncoupling of oxidative phosphorylation. 2. Alternative mechanisms: intrinsic uncoupling or decoupling? *Biochemistry* 26: 7339-7347, 1987.
209. **Pietrobon D, Zoratti M, and Azzone GF.** Molecular slipping in redox and ATPase H⁺ pumps. *Biochim Biophys Acta* 723: 317-321, 1983.
210. **Podolin DA, Pagliassotti MJ, Gleeson TT, and Mazzeo RS.** Influence of endurance training on the age-related decline in hepatic glyconeogenesis. *Mech Ageing Dev* 75: 81-93, 1994.
211. **Powers SK, Criswell D, Lawler J, Ji LL, Martin D, Herb RA, and Dudley G.** Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 266: R375-380, 1994.
212. **Powers SK, Criswell D, Lawler J, Martin D, Lieu FK, Ji LL, and Herb RA.** Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. *Am J Physiol* 265: H2094-2098, 1993.
213. **Powers SK and Lennon SL.** Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58: 1025-1033, 1999.
214. **Prabhakar NR and Overholt JL.** Cellular mechanisms of oxygen sensing at the carotid body: heme proteins and ion channels. *Respir Physiol* 122: 209-221, 2000.
215. **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.
216. **Quiles JL, Huertas JR, Manas M, Ochoa JJ, Battino M, and Mataix J.** Dietary fat type and regular exercise affect mitochondrial composition and function depending on specific tissue in the rat. *J Bioenerg Biomembr* 33: 127-134, 2001.
217. **Radak Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW, and Goto S.** Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev*, 2007.
218. **Radak Z, Chung HY, Naito H, Takahashi R, Jung KJ, Kim HJ, and Goto S.** Age-associated increase in oxidative stress and nuclear factor kappaB activation are attenuated in rat liver by regular exercise. *Faseb J* 18: 749-750, 2004.

219. **Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvari M, Nyakas C, and Goto S.** The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 27: 69-74, 1999.
220. **Radak Z, Naito H, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Takahashi R, Cardozo-Pelaez F, and Goto S.** Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers Arch* 445: 273-278, 2002.
221. **Radak Z, Sasvari M, Nyakas C, Taylor AW, Ohno H, Nakamoto H, and Goto S.** Regular training modulates the accumulation of reactive carbonyl derivatives in mitochondrial and cytosolic fractions of rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 383: 114-118, 2000.
222. **Radeva-Domustchieva D and Russanov E.** Effect of exhaustive swimming on the oxidative phosphorylation and the activity of some enzymes in rat liver mitochondria. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 2: 72-77, 1976.
223. **Raisonnier A.** Cours de Biochimie. Jussieu, 2004.
224. **Ramsay RR, Steenkamp DJ, and Husain M.** Reactions of electron-transfer flavoprotein and electron-transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductase. *Biochem J* 241: 883-892, 1987.
225. **Reid M.** *Muscle fatigue: mechanisms and regulation.* In: *Sen CK, Packer L, Hanninen: Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise.* Elsevier, pp. 599-629., 2000.
226. **Reid MB, Haack KE, Franchek KM, Valberg PA, Kobzik L, and West MS.** Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J Appl Physiol* 73: 1797-1804, 1992.
227. **Reid MB, Khawli FA, and Moody MR.** Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle. *J Appl Physiol* 75: 1081-1087, 1993.
228. **Richard MJ, Portal B, Meo J, Coudray C, Hadjian A, and Favier A.** Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. *Clin Chem* 38: 704-709, 1992.
229. **Ritland S.** Exercise and liver disease. *Sports Med* 6: 121-126, 1988.
230. **Roy S, Sen CK, and Packer L.** Determination of cell-cell adhesion in response to oxidants and antioxidants. *Methods Enzymol* 300: 395-401, 1999.
231. **Sakamoto K and Goodyear LJ.** Invited review: intracellular signaling in contracting skeletal muscle. *J Appl Physiol* 93: 369-383, 2002.
232. **Salo DC, Donovan CM, and Davies KJ.** HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. *Free Radic Biol Med* 11: 239-246, 1991.
233. **Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, Goldberg AL, and Spiegelman BM.** PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16260-16265, 2006.
234. **Schafer E, Seelert H, Reifschneider NH, Krause F, Dencher NA, and Vonck J.** Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 281: 15370-15375, 2006.
235. **Schagger H and Pfeiffer K.** Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J* 19: 1777-1783, 2000.
236. **Schlame M, Rua D, and Greenberg ML.** The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res* 39: 257-288, 2000.
237. **Schonfeld P and Wojtczak L.** Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse electron transport but increase it at the forward transport. *Biochim Biophys Acta* 1767: 1032-1040, 2007.
238. **Schreck R, Rieber P, and Baeuerle PA.** Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *Embo J* 10: 2247-2258, 1991.
239. **Schwerzmann K, Cruz-Orive LM, Eggman R, Sanger A, and Weibel ER.** Molecular architecture of the inner membrane of mitochondria from rat liver: a combined biochemical and stereological study. *J Cell Biol* 102: 97-103, 1986.
240. **Selye H.** What is stress? *Metabolism* 5: 525-530, 1956.
241. **Sen CK.** Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol* 79: 675-686, 1995.
242. **Servais S.** *Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3.* Lyon: Université Claude Bernard, 2004.
243. **Servais S, Couturier K, Koubi H, Rouanet JL, Desplanches D, Sornay-Mayet MH, Sempore B, Lavoie JM, and Favier R.** Effect of voluntary exercise on H₂O₂ release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Free Radic Biol Med* 35: 24-32, 2003.
244. **Sherer TB, Betarbet R, and Greenamyre JT.** Environment, mitochondria, and Parkinson's disease. *Neuroscientist* 8: 192-197, 2002.
245. **Shimokata K, Katayama Y, Murayama H, Suematsu M, Tsukihara T, Muramoto K, Aoyama H, Yoshikawa S, and Shimada H.** The proton pumping pathway of bovine heart cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 4200-4205, 2007.

246. **Shiva S, Crawford JH, Ramachandran A, Ceaser EK, Hillson T, Brookes PS, Patel RP, and Darley-Usmar VM.** Mechanisms of the interaction of nitroxyl with mitochondria. *Biochem J* 379: 359-366, 2004.
247. **Sjodin B, Hellsten Westing Y, and Apple FS.** Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med* 10: 236-254, 1990.
248. **Soh N.** Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species. *Anal Bioanal Chem* 386: 532-543, 2006.
249. **Stadtman ER.** Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* 62: 797-821, 1993.
250. **Stadtman ER and Levine RL.** Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 899: 191-208, 2000.
251. **Staniek K and Nohl H.** Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Biochim Biophys Acta* 1460: 268-275, 2000.
252. **Starnes JW, Barnes BD, and Olsen ME.** Exercise training decreases rat heart mitochondria free radical generation but does not prevent Ca²⁺-induced dysfunction. *J Appl Physiol* 102: 1793-1798, 2007.
253. **St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, and Brand MD.** Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277: 44784-44790, 2002.
254. **St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, and Spiegelman BM.** Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127: 397-408, 2006.
255. **St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB, and Spiegelman BM.** Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J Biol Chem* 278: 26597-26603, 2003.
256. **Suliman HB, Carraway MS, Welty-Wolf KE, Whorton AR, and Piantadosi CA.** Lipopolysaccharide stimulates mitochondrial biogenesis via activation of nuclear respiratory factor-1. *J Biol Chem* 278: 41510-41518, 2003.
257. **Sun F, Huo X, Zhai Y, Wang A, Xu J, Su D, Bartlam M, and Rao Z.** Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* 121: 1043-1057, 2005.
258. **Sun MG, Williams J, Munoz-Pinedo C, Perkins GA, Brown JM, Ellisman MH, Green DR, and Frey TG.** Correlated three-dimensional light and electron microscopy reveals transformation of mitochondria during apoptosis. *Nat Cell Biol* 9: 1057-1065, 2007.
259. **Tager JM, Groen AK, Wanders RJ, Duszynski J, Westerhoff HV, and Vervoorn RC.** Control of mitochondrial respiration. *Biochem Soc Trans* 11: 40-43, 1983.
260. **Talbot DA, Lambert AJ, and Brand MD.** Production of endogenous matrix superoxide from mitochondrial complex I leads to activation of uncoupling protein 3. *FEBS Lett* 556: 111-115, 2004.
261. **Tarpey MM and Fridovich I.** Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res* 89: 224-236, 2001.
262. **Taylor RP and Starnes JW.** Age, cell signalling and cardioprotection. *Acta Physiol Scand* 178: 107-116, 2003.
263. **Terada S, Nakagawa H, Nakamura Y, and Muraoka I.** Calcineurin is not involved in some mitochondrial enzyme adaptations to endurance exercise training in rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 90: 210-217, 2003.
264. **Thannickal VJ and Fanburg BL.** Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1005-1028, 2000.
265. **Thirunavukkarasu V, Balakrishnan SD, Ravichandran MK, and Anuradha CV.** Influence of 6-week exercise training on erythrocyte and liver antioxidant defense in hyperinsulinemic rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 135: 31-37, 2003.
266. **Toledo FG, Watkins S, and Kelley DE.** Changes induced by physical activity and weight loss in the morphology of intermyofibrillar mitochondria in obese men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 3224-3227, 2006.
267. **Tonkonogi M, Krook A, Walsh B, and Sahlin K.** Endurance training increases stimulation of uncoupling of skeletal muscle mitochondria in humans by non-esterified fatty acids: an uncoupling-protein-mediated effect? *Biochem J* 351 Pt 3: 805-810, 2000.
268. **Tretter L and Adam-Vizi V.** Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of [alpha]-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *J Neurosci* 20: 8972-8979, 2000.
269. **Turcotte LP and Brooks GA.** Effects of training on glucose metabolism of gluconeogenesis-inhibited short-term-fasted rats. *J Appl Physiol* 68: 944-954, 1990.
270. **Turpaev KT.** Reactive oxygen species and regulation of gene expression. *Biochemistry (Mosc)* 67: 281-292, 2002.
271. **Turrens JF.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552: 335-344, 2003.
272. **Turrens JF.** Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17: 3-8, 1997.

-
273. **Turrens JF, Freeman BA, and Crapo JD.** Hyperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes. *Arch Biochem Biophys* 217: 411-421, 1982.
274. **Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, and Flohe L.** Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 285: 1393-1396, 1999.
275. **Ushio-Fukai M.** Redox signaling in angiogenesis: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res* 71: 226-235, 2006.
276. **Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, and Monsalve M.** PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 66: 562-573, 2005.
277. **Veal EA, Day AM, and Morgan BA.** Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell* 26: 1-14, 2007.
278. **Venditti P, Bari A, Di Stefano L, and Di Meo S.** Role of mitochondria in exercise-induced oxidative stress in skeletal muscle from hyperthyroid rats. *Arch Biochem Biophys* 463: 12-18, 2007.
279. **Venditti P and Di Meo S.** Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. *Arch Biochem Biophys* 331: 63-68, 1996.
280. **Venditti P and Di Meo S.** Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. *Int J Sports Med* 18: 497-502, 1997.
281. **Venditti P, Masullo P, and Di Meo S.** Effect of training on H₂O₂ release by mitochondria from rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 372: 315-320, 1999.
282. **Winder WW.** Control of hepatic glucose production during exercise. *Med Sci Sports Exerc* 17: 2-5, 1985.
283. **Winder WW and Hardie DG.** AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol* 277: E1-10, 1999.
284. **Winder WW, Holmes BF, Rubink DS, Jensen EB, Chen M, and Holloszy JO.** Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 88: 2219-2226, 2000.
285. **Winder WW, Taylor EB, and Thomson DM.** Role of AMP-activated protein kinase in the molecular adaptation to endurance exercise. *Med Sci Sports Exerc* 38: 1945-1949, 2006.
286. **Wisloff U, Helgerud J, Kemi OJ, and Ellingsen O.** Intensity-controlled treadmill running in rats: VO₂ max and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H1301-1310, 2001.
287. **Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, and Spiegelman BM.** Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98: 115-124, 1999.
288. **Yu BP.** Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radic Biol Med* 21: 651-668, 1996.
289. **Zanconato S, Moromisato DY, Moromisato MY, Woods J, Brasel JA, Leroith D, Roberts CT, Jr., and Cooper DM.** Effect of training and growth hormone suppression on insulin-like growth factor I mRNA in young rats. *J Appl Physiol* 76: 2204-2209, 1994.
290. **Zhang DX and Gutterman DD.** Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H2023-2031, 2007.
291. **Zhang J, Frerman FE, and Kim JJ.** Structure of electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase and electron transfer to the mitochondrial ubiquinone pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16212-16217, 2006.
292. **Zhou LZ, Johnson AP, and Rando TA.** NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med* 31: 1405-1416, 2001.
293. **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.

COMMUNICATIONS

Communications orales :

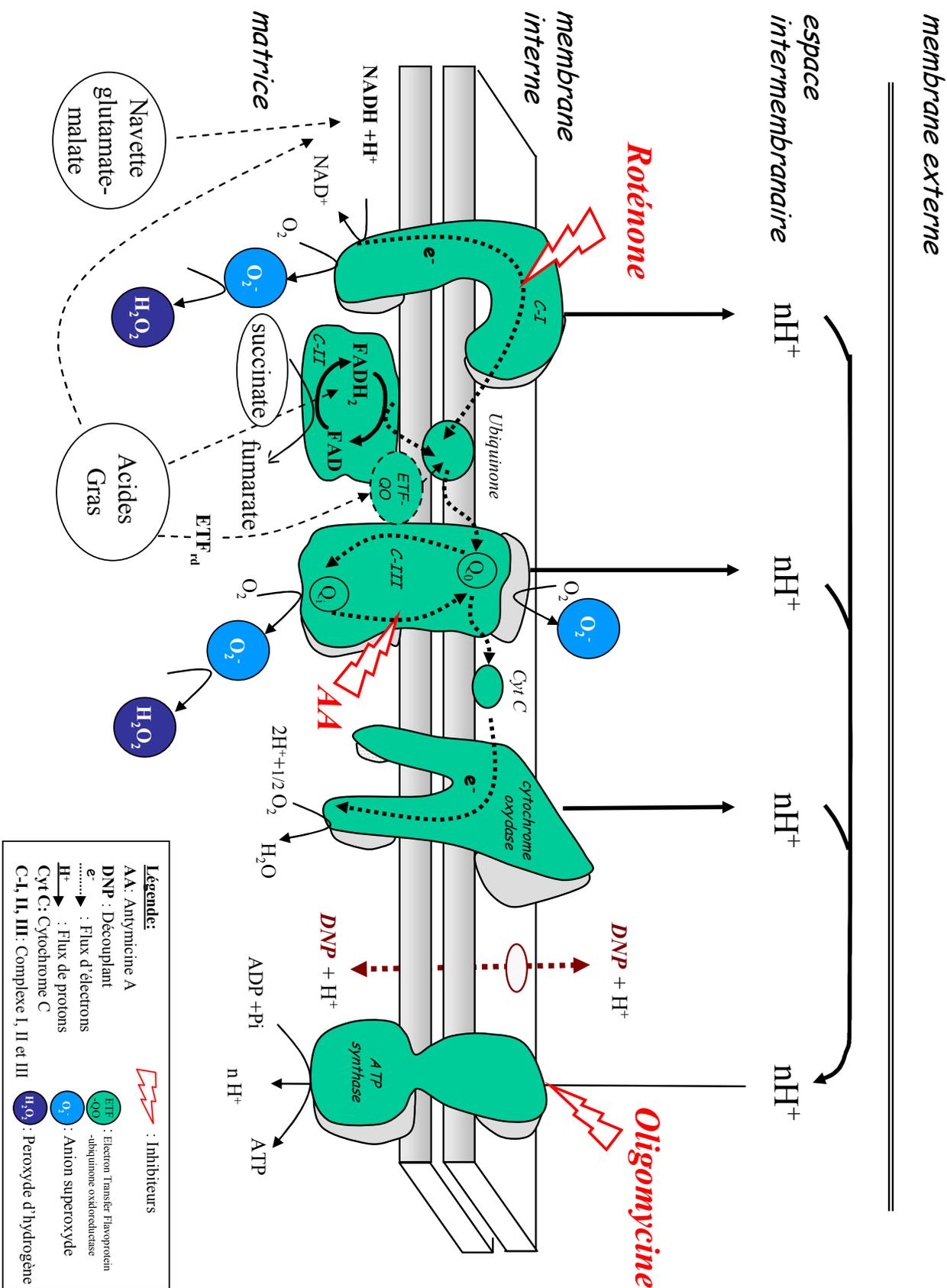
1. **Coisne T.** *Fonctionnement mitochondrial, production de radicaux libres et modulations par l'exercice.*

Congrès du Groupe Français de Bioénergétique, Ile d'Oléron, France, 21-24 juin 2007.

2. **Tom Coisne, Roland Favier, Xavier Leverve et Hervé Dubouchaud.** *Mitochondrial Function, production of free radicals and modulations through exercise.*

12th International ACAPS Conference, Leuven, Belgique, 31 October-2 November 2007.

ANNEXE



Contribution à l'étude des effets de l'activité physique sur le fonctionnement mitochondrial et la production de radicaux libres.

Le but de ce travail consistait à étudier les effets d'une activité physique modérée aiguë ou chronique sur le fonctionnement mitochondrial musculaire et hépatique.

Nous avons étudié en parallèle la respiration mitochondriale et la production de ROS estimée par la mesure de l'H₂O₂ en présence de la sonde Amplex Red. Nous avons montré que l'exercice était à l'origine d'une augmentation de la production radicalaire et cela de façon persistante après 2h de récupération dans le muscle mais qui était décalée dans le foie. Cette production apparaît comme tolérée par la mitochondrie dont le statut antioxydant n'est pas affecté. Des mesures en présence de substrats et inhibiteurs spécifiques de la chaîne respiratoire mitochondriale, permettant d'isoler fonctionnellement les complexes de l'oxydation phosphorylante, nous ont permis de révéler des adaptations spécifiques des tissus.

La deuxième partie du travail concernait l'étude de l'activité physique chronique modérée qui induit une augmentation de densité mitochondriale à la fois dans le muscle et le foie, associée à des adaptations fonctionnelles. La mitochondrie musculaire semble en effet plus efficace pour extraire des équivalents réduits en provenance des acides gras à travers un processus de *slipping métabolique*. La mitochondrie hépatique présente une amélioration de rendement d'oxydation en état phosphorylant à partir de substrats du complexe I. Les résultats suggèrent un fonctionnement diminué des mitochondries en réponse à l'exercice compensé par une augmentation du contenu en unités fonctionnelles. Les sites de production de ROS à l'exercice apparaissent tissu spécifique. En effet on observe que l'exercice modifie la production d'H₂O₂ à partir du complexe III dans le muscle et du I dans le foie.

L'utilisation d'oligonucléotides antisens de PGC-1 α , destinée à réprimer l'expression protéique de PGC-1 α , n'a pas d'influence sur l'augmentation de densité mitochondriale induite par l'entraînement au niveau musculaire mais l'inhibe complètement dans le foie. Des adaptations fonctionnelles liées à l'absence de cette protéine régulatrice, passant par une perturbation de la respiration et de la production de ROS semblent confirmer un rôle majeur de PGC-1 α dans les adaptations mitochondriales tissu spécifiques à l'exercice. Ces résultats suggèrent que les ROS pourraient contribuer par rétrocontrôle sur PGC-1 α aux adaptations énergétiques induites par l'activité physique.

MOTS-CLES : Exercice, stress oxydant, H₂O₂, mitochondrie, foie, muscle, PGC-1 α

ABSTRACT

Progress on the understanding of mitochondria function and reactive oxygen species production to exercise.

The aim of this work was to study hepatic and muscular mitochondria function in response to chronic or acute exercise.

We have simultaneously studied the mitochondrial oxygen consumption and free radical production based on the H₂O₂ production with Amplex Red as a probe. We have shown that a single bout of exercise increases free radical production that was persistent for 2 hours in muscle while it was delayed in liver. This free radical production appears to be tolerated by the mitochondria through the antioxidant pool that remained unaffected. Measurements with specific substrates and inhibitors on the electron transport chain that are useful to functionally isolate the different respiratory complexes allowed us to determine specific sites of adaptations.

In a second part, we tested the effect of moderate chronic exercise that induced increases in mitochondrial density in muscle and more originally in liver, along with functional adaptations. Muscle mitochondria seems to have a better efficiency to extract reduced equivalents from fatty acids through a process named *metabolic slipping*. Liver mitochondria displayed an enhanced oxidation yield in ADP-stimulated respiratory status with complex I substrates. Results suggest that the decrease in mitochondrial functioning is compensated by the increase in the tissue mitochondrial density, as shown by parallel increases in CS activity. The sites of ROS production appear to be tissue specific. In fact, exercise appears to affect mostly the H₂O₂ production from complex III in muscle mitochondria but complex I in liver mitochondria.

The use of PGC-1 α antisense oligonucleotides, in order to decrease the PGC-1 α protein expression, doesn't affect mitochondrial biogenesis induced by endurance training in muscle but totally inhibit the training-induced mitochondrial biogenesis in liver. Functional adaptations (i.e. altered respiratory control and ROS production) linked to the absence of this protein seem to confirm the essential role of PGC-1 α in tissue-specific mitochondrial adaptations to exercise. These results suggest that free radicals could play a role by feedback control of PGC-1 α , on exercise-induced mitochondrial adaptations.

KEYWORDS: Exercise, oxidative stress, H₂O₂, mitochondria, liver, muscle, PGC-1 α
